

## **INFORMATION TO USERS**

**This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.**

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.**

**In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.**

**Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.**

**Photographs included in the original manuscript have been reproduced xerographically in this copy. Higher quality 6" x 9" black and white photographic prints are available for any photographs or illustrations appearing in this copy for an additional charge. Contact UMI directly to order.**

**Bell & Howell Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600**

**UMI<sup>®</sup>**

**Université de Sherbrooke**

**MÉCANISMES D'ATTÉNUATION DE L'EXPRESSION DU GÈNE  
HAPTOGLOBINE PAR LE TGF $\beta$  DANS LES CELLULES  
INTESTINALES ÉPITHÉLIALES**

**Par**

**Shun-Jiang Yu**

**Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du  
grade de maître ès sciences (M.Sc.)**

**Sherbrooke, Québec, Décembre 1999**



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

**0-612-67340-5**

**Canada**

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES .....	ii
LISTE DE FIGURES .....	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	vii
LISTE DES PUBLICATIONS.....	x
RÉSUMÉ.....	xi
 I. INTRODUCTION.....	 1
1. Réponse inflammatoire et implication de la famille des facteurs de transcription C/EBPs .....	 1
2. Réponse inflammatoire intestinale .....	4
3. Mécanisme d'action et rôles du TGFβ .....	7
4. Description du projet de recherche .....	12
 II. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	 14
1. Culture cellulaire .....	14
2. Extraction des ARNs totaux et analyse par Northern .....	14
2.1 Extraction des ARNs totaux.....	14
2.2 Northern blot.....	15
2.3 Préparation des sondes radioactives.....	16
2.4 Préhybridation et hybridation.....	17

3. Extraction des protéines et analyse par Western .....	17
4. Activité de liaison des protéines à l'ADN (gel de rétention).....	18
4.1 Extraction des protéines nucléaires.....	18
4.2 Préparation des oligonucléotides pour les sondes radioactives.....	19
4.3 Gel de rétention.....	20
5. Mutagenèse site spécifique du promoteur de l'haptoglobine.....	21
6. Transfections transitoires et essai luciférase .....	22
7. Analyses statistiques .....	23
 III. RÉSULTATS .....	 24
1. Atténuation par le TGF $\beta$ de l'expression du gène haptoglobine, de C/EBP $\beta$ et de C/EBP $\delta$ induite par la dexaméthasone .....	 24
2. Détermination des voies de signalisation impliquées dans l'atténuation de l'expression de l'haptoglobine par le TGF $\beta$ .....	 26
 IV. DISCUSSION .....	 40
1. Les C/EBPs sont impliqués à la fois dans l'induction par les glucocorticoïdes et l'atténuation par le TGF $\beta$ de l'haptoglobine .....	 40
2. Les MAP kinases p42/p44 sont impliquées dans l'atténuation de l'expression de l'haptoglobine par le TGF $\beta$ .....	 43
3. Smad3 pourrait être impliqué dans le processus d'atténuation de l'expression de l'haptoglobine par le TGF $\beta$ .....	 48
 V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....	 50

REMERCIEMENTS .....	52
---------------------	----

RÉFÉRENCES .....	53
------------------	----

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Effets cellulaires et moléculaires du TGF $\beta$ .....	10
Figure 2.	Inhibition par le TGF $\beta$ des niveaux d'ARNm du gène haptoglobine induits par la dexaméthasone dans les cellules IEC-6.....	29
Figure 3.	Inhibition par le TGF $\beta$ des niveaux d'ARNm des facteurs de transcription C/EBP $\beta$ et C/EBP $\delta$ induits par la dexaméthasone dans les cellules IEC-6.....	30
Figure 4.	Atténuation par le TGF $\beta$ de la capacité des complexes C/EBP à lier l'ADN.....	31
Figure 5.	Mutagenèse des sites Hapto A et Hapto C du promoteur de l'haptoglobine.....	32
Figure 6.	La mutation des sites d'interaction Hapto A et Hapto C du promoteur du gène de l'haptoglobine abolit la réponse à la dexaméthasone et au TGF $\beta$ .....	33
Figure 7.	Stimulation de l'activité des MAP kinases p42/p44 par le TGF $\beta$ dans les cellules IEC-6.....	34

Figure 8.	Le PD98059, un inhibiteur de MAPKK (MEK), inhibe l'atténuation de l'expression de l'haptoglobine par le TGFβ.....	35
Figure 9.	Un dominant négatif de <i>ras</i> , <i>ras N</i> , augmente l'activité du promoteur de l'haptoglobine.....	36
Figure 10.	Smad3 inhibe l'activité du promoteur de l'haptoglobine.....	37
Figure 11.	Smad3 inhibe l'activation du promoteur de l'haptoglobine par les isoformes C/EBP.....	38
Figure 12.	Induction de la capacité de liaison de Smad1 et Smad3 par le TGFβ.....	39
Figure 13.	Effets du TGFβ sur les cellules intestinales épithéliales.....	44



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN:	acide désoxyribonucléique
APP:	protéines de réponse inflammatoire aiguë (acute phase plasma protein)
ARN:	acide ribonucléique
CaMK :	protéine kinase calmoduline-dépendante
C/EBP:	protéine liant l'enhancer CCAAT (CCAAT/Enhancer binding protein)
°C:	degré Celsius
cm:	centimètre
dCTP:	désoxycytidine-5' - triphosphate
DEXA:	dexaméthasone
DMEM:	Milieu d'Eagle modifié de Dulbecco
DTT:	dithiothréitol
EDTA:	disodium éthylènediamine tétraacétate
EGTA:	éthylèneglycol-bis-(β-aminoéthyle éther) acide tétraacétique
FBS:	sérum bovin foetal
Gadd 153:	gène d'arrêt de croissance et de dommage à l'ADN (growth arrest and DNA damage gene)
GAPDH:	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GRE:	élément de réponse aux glucocorticoïdes
h:	heure
HEPES:	4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthane sulfate

<b>HNF:</b>	<b>facteur nucléaire des hépatocytes (hepatocyte nuclear factor)</b>
<b>IEC-6:</b>	<b>cellules épithéliales intestinales de crypte de rat</b>
<b>IL-1:</b>	<b>interleukine-1</b>
<b>IL-6:</b>	<b>interleukine-6</b>
<b>j:</b>	<b>jour</b>
<b>kb:</b>	<b>kilobase</b>
<b>kD:</b>	<b>kilodalton</b>
<b>kg:</b>	<b>kilogramme</b>
<b>LPS:</b>	<b>lipopolysaccharides</b>
<b>M:</b>	<b>molaire</b>
<b>mA :</b>	<b>milliampère</b>
<b>MAP kinase:</b>	<b>protéine kinase activée en réponse aux mitogènes (mitogen activated protein kinase)</b>
<b>mg:</b>	<b>milligramme</b>
<b>ml:</b>	<b>millilitre</b>
<b>mM:</b>	<b>millimolaire</b>
<b>MOPS:</b>	<b>acide sulfonique 3-(-N-Morpholino) propane</b>
<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b>	<b>facteur nucléaire-kappa B</b>
<b>ng:</b>	<b>nanogramme</b>
<b>nm:</b>	<b>nanomètre</b>
<b>NP-40:</b>	<b>Nonidet P-40</b>
<b>PBS:</b>	<b>tampon phosphate salin</b>
<b>PCR:</b>	<b>réaction de polymérase en chaîne</b>

PKA :	protéine kinase A
PKC :	protéine kinase C
PMSF:	phénylméthylsulfonyl de fluorure
rpm:	révolution par minute
RT-PCR:	reverse transcriptase-réaction de polymérase en chaîne
SDS:	dodécyl sulfate de sodium
TBE:	tampon tris-borate
TBS:	tampon tris salin
TE:	tampon tris EDTA
TEMED:	tétraméthyléthylènediamine
TGF $\beta$ :	transforming growth factor $\beta$
TNF $\alpha$ :	tumor necrosis factor $\alpha$
TPA:	phorbol 12-myristate 13-acétate
TRE:	élément de réponse au TPA (TPA response element)
TRIS:	tris (hydroxyméthyl) aminométhane
$\mu$ g:	microgramme
$\mu$ l:	microlitre
$\mu$ M:	micromolaire
UV :	ultraviolet
V:	volts

## LISTE DES PUBLICATIONS

1. Yu S.J., Boudreau F., Houde M., Rivard N., and Asselin C. (1999). Attenuation of haptoglobin gene expression by TGF $\beta$  in intestinal epithelial cells requires the MAP kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**: 544- 549.
2. Boudreau F., Zannoni S., Pelletier N., Bardati T., Yu S.J., and Asselin C. (1999). Negative regulation of glucocorticoid- dependent induction of c-fos by *ras* in intestinal epithelial cells. *Mol. Cell. Biochem.* **195**: 99- 111.
3. Pelletier N., Boudreau F., Yu S.J., Zannoni S., Boulanger V., and Asselin C. (1998). Activation of haptoglobin gene expression by cAMP involves CCAAT/Enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett.* **439**: 275- 280.
4. Boudreau F., Yu S.J., and Asselin C. (1998). CCAAT/Enhancer binding protein  $\beta$  and  $\delta$  regulate  $\alpha$ -1 acid glycoprotein expression in rat intestinal epithelial cells. *DNA Cell Biol.* **17**: 669- 677.

# **Mécanismes d'atténuation de l'expression du gène haptoglobine par le TGF $\beta$ dans les cellules intestinales épithéliales**

**Par: Shun-Jiang Yu**

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences, Département d'Anatomie et de Biologie cellulaire, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H 5N4

## **RÉSUMÉ**

Le TGF $\beta$  est une cytokine multi-fonctionnelle responsable de l'arrêt de prolifération des cellules et de la restitution de l'épithélium intestinal lors de l'inflammation. Nous avons déjà démontré que les gènes de réponse inflammatoire et les C/EBPs sont induits dans l'intestin de rat. De plus, l'expression des gènes de réponse inflammatoire (APPs) et des C/EBPs est modulée par des cytokines et les glucocorticoïdes dans la lignée cellulaire intestinale de rat IEC-6. Le TGF $\beta$  atténue l'expression des gènes APPs  $\alpha$ -acide glycoprotéine et haptoglobine induits lors d'une réponse inflammatoire dans les cellules IEC-6. L'objectif de notre recherche était de déterminer les mécanismes impliqués dans la régulation négative de l'haptoglobine par le TGF $\beta$ . Nous avons observé par Northern que le TGF $\beta$  réduit l'expression induite par les glucocorticoïdes, des ARNm de l'haptoglobine et des facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$ . Des gels de rétention

montrent que la liaison des protéines C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  aux sites HaptoA et HaptoC du promoteur de l'haptoglobine est aussi diminuée. Les sites HaptoA et HaptoC sont nécessaires à la fois pour la stimulation par les glucocorticoïdes, et l'inhibition par le TGF $\beta$  du promoteur de l'haptoglobine, tel que déterminé par transfections transitoires de mutants site-spécifiques. Nos résultats montrent que le TGF $\beta$  active les MAP kinases. Dans des transfections transitoires, un inhibiteur spécifique de la voie des MAP kinases, le PD 98059, inhibe la réponse au TGF $\beta$  alors que la co-transfection d'un dominant-négatif de *ras* augmente l'expression à partir du promoteur haptoglobine. Nous avons aussi démontré par co-transfection transitoire que Smad3, un facteur de transcription induit directement par le TGF $\beta$ , diminue l'expression du gène haptoglobine, alors que Smad2 n'a pas d'effet. De plus, le TGF $\beta$  induit la capacité de liaison des protéines Smad1 et Smad3 (pas Smad2) liée à une séquence d'ADN spécifique, tel que déterminé par gel de rétention. Ces résultats démontrent que les isoformes C/EBPs (surtout  $\beta$  et  $\delta$ ) sont impliqués à la fois dans l'induction par les glucocorticoïdes et dans l'atténuation par le TGF $\beta$  de l'expression de l'haptoglobine. Le TGF $\beta$  pourrait atténuer l'expression de ce gène indirectement en réprimant les isoformes C/EBPs ou directement, par l'intermédiaire de Smad3. De plus, les MAP kinases p42/p44 pourraient être impliquées dans une voie de signalisation initiée par le TGF $\beta$  et menant à l'atténuation de l'haptoglobine.

**Mots Clés:** TGF $\beta$ , Dexaméthasone, Expression génétique, Réponse inflammatoire, Haptoglobine, Facteur de transcription C/EBP, MAP kinase, IEC-6.

## **I. INTRODUCTION**

### **1. RÉPONSE INFLAMMATOIRE ET IMPLICATION DE LA FAMILLE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION C/EBPs**

La réponse inflammatoire est une réponse de l'organisme suite à une blessure, une infection bactérienne ou virale, une nécrose tissulaire, etc.. La phase de la réponse inflammatoire aiguë (APR) comporte notamment la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur nécrosant des tumeurs (TNF $\alpha$ ), les interleukines IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6 (Molmenti et al., 1993; Baumann et Gauldie, 1994; Salier et al., 1997; Stenson, 1999). Ces cytokines sont libérées par les macrophages, les cellules endothéliales vasculaires, les fibroblastes et les cellules épithéliales. Le foie est un des organes impliqués dans la réponse inflammatoire aiguë systémique. Sous l'action des cytokines pro-inflammatoires, la biosynthèse de nombreuses protéines hépatiques (protéines de la phase aiguë ou APPs) est modifiée, avec des changements importants de leur concentration plasmatique durant l'inflammation (Baumann et Gauldie, 1994; Alevizopoulos et Mermod, 1997). Les APPs se distinguent en 2 types: les APPs de type I sont celles dont la biosynthèse est contrôlée par IL-1 et TNF $\alpha$ , agissant seuls ou en association avec IL-6. L'induction des APPs de type II dépend de l'action de l'IL-6, agissant seule ou en combinaison avec les glucocorticoïdes (Koj et al., 1993; Campos et al., 1993; Mackiewicz, 1997). Ces protéines, dont l'haptoglobine et l' $\alpha$ -acide glycoprotéine, participent à la défense de l'hôte. Par exemple, l'haptoglobine jouerait un

rôle dans l'évacuation de l'hémoglobine, inhiberait la production de radicaux libres et stimulerait l'angiogénèse (Mackiewicz, 1997).

L'action des cytokines sur les cellules entraîne des changements dans la signalisation intracellulaire, résultant en l'activation de kinases, comme les MAP kinases (voir à la section 3) et de facteurs de transcription contrôlant la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et des gènes APPs (Mackiewicz, 1997). L'activation de ces kinases entraîne la phosphorylation de certaines classes de facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B, AP-1, et C/EBP qui sont impliqués dans l'expression des gènes cibles (Lee et Young, 1996; Koj, 1996). De ces différents facteurs de transcription, les C/EBPs (CCAAT/enhancer binding proteins) sont impliqués dans la régulation positive de l'expression des gènes APPs et dans l'initiation de la réponse inflammatoire du foie (Poli, 1998). Les C/EBPs sont considérés comme des médiateurs directs de la réponse inflammatoire dans les hépatocytes (Burgess-Beusse et al., 1998). En effet, ces facteurs de transcription sont modulés par les cytokines pro-inflammatoires aux niveaux transcriptionnel, post-transcriptionnel, ou traductionnel (Salier et al., 1997). Les C/EBPs sont exprimés de façon restreinte dans le foie, le tissu adipeux et l'intestin (Birkenmeier et al., 1989; Blais et al., 1995). La famille des C/EBPs comporte plusieurs isoformes dont C/EBP $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ , et gadd153 (CHOP10). En plus d'un domaine de transactivation permettant des interactions protéine-protéine, les C/EBPs sont composés d'une région riche en acides aminés basiques se liant à l'ADN, et d'un domaine de dimérisation, la fermeture de glissière à leucines (Johnson, 1993). Ces protéines sont capables de former des homo- ou hétéro-dimères entre eux par leur domaine de dimérisation. L'isoforme



C/EBP $\alpha$  est le premier isoforme identifié dans le foie (Landschulz et al., 1988). Le gène C/EBP $\alpha$  est induit durant la différenciation terminale des hépatocytes et des adipocytes (Birkenmeier et al., 1989; Yeh et al., 1995), et est responsable de l'activation de plusieurs gènes exprimés lors de l'état différencié hépatocytaire et adipocytaire (Friedman et al., 1989; Lin et Lane, 1992). Plusieurs évidences montrent un rôle important de C/EBP $\alpha$  dans l'adipogénèse. Une expression d'ARN anti-sens contre C/EBP $\alpha$  inhibe la différenciation terminale des adipocytes en culture (Samuelsson et al., 1991; Lin et Lane, 1992). De plus, l'expression ectopique de C/EBP $\alpha$  induit la différenciation adipocytaire en culture (Umek et al., 1991; Lin et Lane, 1994). L'inactivation du gène C/EBP $\alpha$  chez la souris résulte en une inhibition de l'accumulation des lipides dans le tissu adipeux, ce qui suggère un rôle important de C/EBP $\alpha$  dans le métabolisme et le maintien d'énergie (Wang et al., 1995).

Les C/EBPs jouent aussi un rôle important dans la réponse inflammatoire. Les isoformes C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  contrôlent la réaction aiguë dans les hépatocytes en se liant à des sites de réponse dans les promoteurs des gènes cibles dont l'haptoglobine et l' $\alpha$ -acide glycoprotéine (Baumann et al., 1992; Baumann et Gauldie, 1994). C/EBP $\beta$  induit l'expression de l'haptoglobine dans les cellules d'hépatomes (Natsuka et al., 1991). De plus, C/EBP $\beta$  peut contrôler l'expression de certains gènes codant pour des cytokines telles que IL-6 (Matsusaka et al., 1993). C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  sont induits dans le foie en réponse aux lipopolysaccharides (LPS), IL-1, IL-6, IFN $\gamma$ , dexaméthasone, AMPc, etc. (Takiguchi, 1998). Par exemple, un site de liaison de CREB (cyclic AMP response element binding protein) est responsable de l'induction de C/EBP $\beta$  en réponse à l'AMPc

via la protéine kinase A (PKA) dans les hépatocytes et les cellules neuronales (Park et al., 1993; Cardinaux et Magistretti, 1996). De plus, les C/EBPs peuvent être modifiés post-traductionnellement par phosphorylation. En effet, une déphosphorylation de C/EBP $\alpha$  stimulée par l'insuline entraîne une réduction de l'activité transcriptionnelle de C/EBP $\alpha$  et des gènes cibles dans les adipocytes en culture par un processus dépendant de l'activité des MAP kinases (protéines kinases activées en réponse aux mitogènes) (Hemati et al., 1997). C/EBP $\beta$  peut être phosphorylé par des kinases telles que PKA, CaMK (protéine kinase calmoduline-dépendante), et MAP kinases p42/p44 entraînant une accumulation nucléaire, une transactivation ou une transrépression selon les types cellulaires (Trautwein et al., 1994; Takiguchi, 1998). Des interactions entre les C/EBPs et d'autres facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B (Vietor et al., 1996) ou le récepteur des glucocorticoïdes (GR) (Nishio et al., 1993) peuvent entraîner des effets additionnels ou synergiques sur l'expression des gènes APPs. L'inactivation du gène C/EBP $\beta$  entraîne des modifications de l'expression des gènes APPs dans le foie (Screpanti et al., 1995). Ces résultats démontrent un rôle important des C/EBPs dans le contrôle de la croissance, de la différenciation cellulaire et de l'induction de la réponse inflammatoire dans plusieurs types cellulaires.

## **2. RÉPONSE INFLAMMATOIRE INTESTINALE**

La formation de l'intestin grêle dépend d'interactions entre l'endoderme et le mésoderme durant la période pré-natale. L'épithélium intestinal de rat est un système dynamique qui se renouvelle de façon rapide et continue par des processus de régénération et de

migration cellulaire à partir de populations de cellules localisées à la base de la crypte (Potten et Loeffler, 1990). L'épithélium est composé d'une simple couche cellulaire constituée de deux unités différentes, soient la crypte de Lieberkühn et la villosité. La crypte correspond à l'unité proliférative de l'épithélium, et est responsable du renouvellement de l'épithélium intestinal (Karam, 1999). Ces cellules souches pluripotentes migrent le long de l'axe crypte-villosité et se différencient en quatre types de cellules, soient les cellules absorbantes, les cellules à mucus, les cellules endocrines et les cellules de Paneth (Gordon et Hermiston, 1994; Babyatsky et Podolsky, 1999). Les cellules de Paneth migrent vers la base de la crypte alors que les trois autres types cellulaires effectuent leur migration le long de la villosité. Les cellules différenciées jouent des rôles importants dans la digestion, l'absorption des nutriments et la protection de la muqueuse épithéliale contre les agents toxiques. Le renouvellement de l'épithélium intestinal qui se fait tous les 2 à 3 jours chez les rongeurs et tous les 5 à 6 jours chez l'homme (Hermiston et al., 1994), est un processus complexe contrôlé par de nombreux facteurs y compris les hormones, les facteurs de croissance, les cytokines, et à la fois les interactions cellule-cellule et cellule-matrice. Plusieurs cytokines, y compris le TGF $\beta$ , contrôlent la prolifération, la différenciation et la sénescence cellulaire au cours du développement intestinal (Hermiston et al., 1994; Babyatsky et Podolsky, 1999).

Il a été démontré que outre le foie, d'autres organes comme l'intestin réagissaient à une réponse inflammatoire par production d'APPs (Fiocchi et Podolsky, 1995). Dans l'intestin, l'inflammation est un processus complexe dépendant d'interactions entre cellules immunitaires et non-immunitaires par l'intermédiaire de cytokines, de facteurs de

croissance et de molécules adhésives agissant comme médiateurs fonctionnels (Fiocchi, 1997). Les cellules épithéliales de la muqueuse de l'intestin constituent un composant intégral du système de la réponse inflammatoire intestinale. Ces cellules participent à la réponse inflammatoire en étant des cibles et des producteurs de cytokines (Stadnyk et Waterhouse, 1997). Au même titre que l'initiation de l'inflammation, la résolution de la réponse inflammatoire est aussi importante pour la contrôler (Koj, 1998). En effet, la prolongation des processus inflammatoires est la cause de nombreuses maladies inflammatoires humaines associées à l'intestin, comme la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn (Sartor, 1994; Fiocchi, 1997, 1998). Chez l'homme, ces maladies chroniques sont des désordres multifactoriels impliquant des interactions entre le système immunitaire, la susceptibilité génétique et l'environnement, notamment la flore bactérienne endogène de l'intestin (Fiocchi, 1997).

Les mécanismes de contrôle de la réponse inflammatoire dans l'intestin sont encore peu connus. Durant les dernières années, nous avons démontré que les isoformes C/EBP $\alpha$ , CEBP $\beta$ , et C/EBP $\delta$  étaient exprimés et contrôlés au niveau de l'ARNm et de la protéine dans les cellules épithéliales intestinales *in vivo* et *in vitro* (Blais et al., 1995; Boudreau et al., 1996, 1997, 1998). Nous avons aussi démontré que les isoformes C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  étaient impliquées dans la régulation des gènes de la réponse inflammatoire par l'AMPc (pour l'haptoglobine) (Pelletier et al., 1998) et par les glucocortocoides (pour l' $\alpha$ -acide glycoprotéine) (Boudreau et al., 1998). Nos résultats ont aussi démontré que le TGF $\beta$  pourrait jouer un rôle important dans la régulation négative de l'expression des gènes APPs, donc dans la régulation de l'inflammation.

### 3. MÉCANISME D'ACTION ET RÔLES DU TGF $\beta$

Une cytokine qui pourrait jouer un rôle important dans le contrôle de la réponse inflammatoire est le TGF $\beta$  (transforming growth factor beta). Le TGF $\beta$  est un polypeptide multifonctionnel impliqué dans la régulation de la différenciation, de la prolifération, de la migration et de l'adhésion cellulaire (Massagué, 1998). Le TGF $\beta$  stimule la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire, y compris le collagène et la fibronectine, et module la synthèse des protéines de phase aiguë (Grande, 1997). La famille du TGF $\beta$ , qui fait partie d'une superfamille comportant les activines et les BMP (bone morphogenetic proteins), compte au moins cinq gènes encodant des protéines distinctes (TGF $\beta$ 1-5) chez les vertébrés (Polyak, 1996; Alevizopoulos et Mermod, 1997; Hu et al., 1998). Tous les isoformes du TGF $\beta$  sont des dimères de 25 kD liés par un pont disulfure (Hu et al., 1998). Il existe trois types de récepteurs transmembranaires pour le TGF $\beta$ , les types I, II, et III (Massagué, 1998; Hu et al., 1998). Les récepteurs de type I et de type II sont des sérine/thréonine kinases impliquées directement dans la signalisation intracellulaire du TGF $\beta$ . Lors de la combinaison avec le ligand extracellulaire, le récepteur de type II s'associe à celui de type I pour former un complexe hétérodimérique. Le récepteur de type I est ensuite phosphorylé dans son domaine glycine-sérine (GS) par celui de type II. L'activation du récepteur du TGF $\beta$  entraîne des modifications positives ou négatives de l'expression de plusieurs gènes cibles. Cette régulation dépend d'une voie directe, la voie des Smads, ou d'une voie indirecte par l'induction de cascades de phosphorylation. Les facteurs de transcription Smads ont été identifiés comme des

médiateurs des signaux du TGF $\beta$  et du BMP (bone morphogenetic protein) entre autres chez *Xenopus*, la souris et l'homme. A ce jour, neuf gènes Smads ont été clonés chez les vertébrés, et chacun est impliqué dans des voies de signalisation différente. Par exemple, Smad2 et Smad3 sont activés par les voies du TGF $\beta$  et de l'activine, tandis que Smad1, Smad5 et Smad8 sont activés principalement par la voie du BMP. Smad4 est un partenaire de dimérisation obligatoire des autres Smads, ce qui entraîne la translocation du complexe au noyau. Par contre, Smad6 et Smad7 sont des antagonistes impliqués dans la régulation négative de l'action des récepteurs, en formant des complexes inactifs (Heldin et al., 1997; Hu et al., 1998; Whitman, 1998). Les facteurs de transcription Smads contiennent des domaines N- et C-terminaux, soient les domaines MH1 et MH2, et un domaine intermédiaire (linker) entre eux. Les deux domaines MH1 et MH2 peuvent interagir entre eux en inhibant mutuellement leurs fonctions. Suite à une phosphorylation du domaine MH2, ces interactions sont modifiées, ce qui entraîne une activation des facteurs. Le domaine MH1 est capable de lier l'ADN, tandis que le domaine MH2 est un domaine de transactivation. De plus, le domaine MH2 est aussi impliqué dans des interactions spécifiques avec les récepteurs activés du TGF $\beta$ . Dans le noyau, il peut contrôler la transcription des gènes en se liant à d'autres co-facteurs ou co-activateurs comme FAST1, P300/CBP, etc.. D'abord, les Smads sont des facteurs de transcription cytoplasmiques qui se lient au récepteur activé par le TGF $\beta$ , entraînant la phosphorylation des Smads et la production de complexes entre différents Smads (1, 2, 3, etc.) et Smad4. Ces complexes transloquent dans le noyau et lient des séquences spécifiques dans les promoteurs des gènes cibles (Macias-Silva et al., 1996; Derynck et Feng, 1997; Heldin et al., 1997; Alevizopoulos et Mermoud, 1997). Le TGF $\beta$  peut aussi

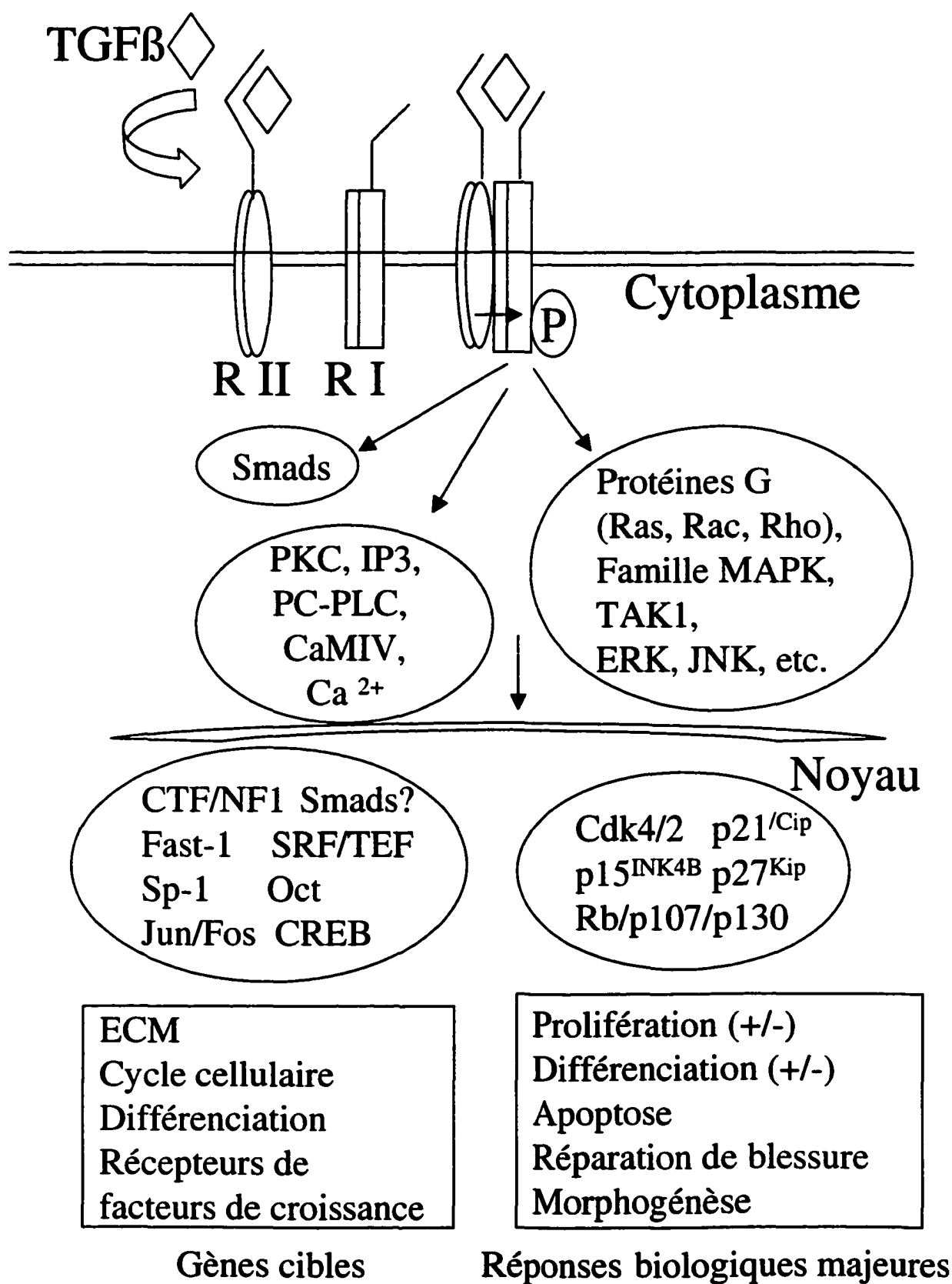
initier des cascades de phosphorylation impliquant le  $\text{Ca}^{++}$ , la protéine kinase C, les protéines G (*ras*), TAK1 (TGF $\beta$ -activated kinase-1), MAP kinases p42/p44, p38 et JNK. Ces différentes voies peuvent affecter la phosphorylation de différents facteurs de transcription (comme Sp1 et CREB) et contrôler leurs actions (Hartsough et Mulder, 1997; Alevizopoulos et Mermod, 1997; Derynck et Feng, 1997). Il est à noter que l'activation de ces différentes voies de signalisation par le TGF $\beta$  dépend du type cellulaire étudié (Figure 1).

Le TGF $\beta$  est exprimé dans l'intestin: il est produit par des cellules épithéliales, par des monocytes de la lamina propria et distribué principalement dans les cellules cryptales (Perdue et McKay, 1994; Dignass et al., 1996; Babyatsky et al., 1996; Stenson, 1999), mais il semble encore à ce jour contradictoire que d'autres études ont rapporté que l'expression du TGF $\beta$  dans les cellules intestinales suivant un gradient le long de l'axe crypte-villosité avec un maximum de production au sommet de la villosité (Murphy, 1998). Le TGF $\beta$  est un inhibiteur de la croissance cellulaire de plusieurs types cellulaires d'origines épithéliale, endothéliale, neuronale, hématopoïétique et lymphocytaire (Grande, 1997). Le TGF $\beta$  inhibe la prolifération des cellules intestinales en réprimant la synthèse de la cycline D1 et l'activité des kinases dépendantes des cyclines (cdks), ou en causant une augmentation des niveaux des inhibiteurs de cdks (cdk2, 4, 6) comme p15<sup>Ink4</sup>, p21<sup>Cip1</sup> et p27<sup>Kip1</sup> (CKIs) (Hartsough et Mulder, 1997; Ko et al., 1998). De plus,

**Figure 1. Effets cellulaires et moléculaires du TGF $\beta$ .**



Figure 1. Effets cellulaires et moléculaires du TGF $\beta$



le TGF $\beta$  est le médiateur le plus important du processus de restitution cellulaire, entraînant une migration cellulaire rapide afin de colmater rapidement en absence de prolifération cellulaire, les espaces créés suite à la destruction des cellules épithéliales par l'inflammation (Sartor, 1994; Stadnyk et Waterhouse, 1997; Podolsky, 1999). Le TGF $\beta$  aurait une action autocrine et paracrine dans ce processus. Durant la restitution, les cascades de MAP kinases p42/p44, JNK et p38 peuvent être activées rapidement suite à la blessure à la monocouche des cellules épithéliales intestinales (Dieckgraefe et al., 1997): le TGF $\beta$  pourrait être impliqué directement ou indirectement dans l'activation de ces kinases. Il a été suggéré que le TGF $\beta$  joue un rôle important à la fois dans l'initiation et la résolution de l'inflammation intestinale avec des activités pro-inflammatoires à court terme et anti-inflammatoires à long terme (Clark et Coker, 1998; Stenson, 1999). D'abord, des souris dans lesquelles le gène TGF $\beta$  a été inactivé montrent une inflammation systémique dans plusieurs organes dont l'intestin (Kulkarni et al., 1993; Kulkarni et Karlsson, 1993; Clark et Coker, 1998). De plus, l'expression du TGF $\beta$  est augmentée dans la muqueuse de patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin telles que la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn (Fiocchi, 1998). Le TGF $\beta$  peut moduler l'expression des gènes APPs et la réaction inflammatoire dans les hépatocytes et dans les cellules épithéliales intestinales (Baumann et Gauldie, 1994; Mackiewicz, 1997; Boudreau et al., 1998). Ces observations suggèrent un rôle important du TGF $\beta$  dans les processus d'inflammation intestinale. Par contre, les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la réponse inflammatoire de l'intestin par le TGF $\beta$  restent encore à élucider.

#### 4. DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE

Dans notre laboratoire, nous avons démontré que les gènes de la réponse inflammatoire et les facteurs de transcription C/EBPs sont induits *in vivo* et *in vitro* dans l'intestin de rat, et que leur expression est modulée par les glucocorticoïdes et les cytokines, incluant le TGF $\beta$ . Bien que le TGF $\beta$  soit capable de moduler l'expression des gènes induits lors de la réponse inflammatoire (APPs) et la réaction de phase aiguë dans les hépatocytes (Mackiewicz, 1997) et dans les cellules intestinales épithéliales (Boudreau et al., 1998), les mécanismes impliqués dans la régulation de ces gènes par le TGF $\beta$  sont encore très peu connus. L'objectif principal du présent travail avait pour but de déterminer les mécanismes impliqués dans le contrôle de la réponse inflammatoire des cellules intestinales épithéliales par le TGF $\beta$ . Dans ce travail, l'approche utilisée dans notre laboratoire était d'évaluer l'importance de ces isoformes C/EBPs dans l'induction par les glucocorticoïdes et l'atténuation de l'expression des gènes APPs par le TGF $\beta$ , et de déterminer le rôle des voies de signalisations empruntant les MAP kinases dans l'atténuation de l'expression de ces gènes. De plus, Nous avons voulu vérifier l'hypothèse que les Smads pouvaient contribuer au processus d'atténuation de l'expression des gènes APPs par le TGF $\beta$ . Nous avons étudié l'expression d'un gène APP (haptoglobine) et des isoformes C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  en réponse à la dexaméthasone et au TGF $\beta$  dans les cellules épithéliales intestinales. La régulation par la dexaméthasone et le TGF $\beta$  a été mesurée dans un modèle de cellules intestinales épithéliales en culture, soit la lignée IEC-6 dérivant de la crypte de l'intestin de rat avant le sevrage et ne se différenciant pas en culture (Quaroni et May, 1980). Nous avons démontré que le TGF $\beta$

pourrait atténuer les processus inflammatoires intestinaux en partie par une régulation négative des facteurs de transcription C/EBPs, et que les cascades de signalisation empruntant les voies des MAP kinases seraient nécessaires à la modulation des effets anti-inflammatoires du TGF $\beta$ . D'autre part, une voie directe d'induction des Smads par le TGF $\beta$  pourrait être impliquée dans l'atténuation de l'expression des gènes induits lors de la réponse inflammatoire intestinale.

## **II. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **1. CULTURE CELLULAIRE**

La lignée cellulaire intestinale de crypte de rat IEC-6 provient de A. Quaroni (Cornell University, Ithaca, NY). Les cellules sont cultivées dans un milieu d'Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) (Gibco-BRL, Burlington, ON), en présence de 5% de sérum bovin foetal (FBS) (ICN, OH), 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine à 37°C dans une atmosphère de 95% d'air et 5% CO<sub>2</sub>. Un jour avant les traitements par le TGFβ et la dexaméthasone, le milieu est remplacé par du DMEM contenant 5% FBS. Le TGFβ (5 ng/ml) et la dexaméthasone (10<sup>-6</sup> M) sont ajoutés aux cellules à une confluence de 80-90%. Les expériences sont effectuées avec des cellules IEC-6 entre le 10<sup>ième</sup> et le 18<sup>ième</sup> passage en culture. Nous avons utilisé la dexaméthasone puisque nous avons démontré que celle-ci induisait les gènes de réponse inflammatoire dans les cellules intestinales épithéliales (Boudreau et al., 1997, 1998). De plus, nous voulions utiliser un agent n'affectant pas les cascades de signalisation empruntant les kinases, afin de déterminer les voies de signalisation empruntées par le TGFβ.

### **2. EXTRACTION DES ARNs TOTAUX ET ANALYSE PAR NORTHERN**

#### **2.1 EXTRACTION DES ARNs TOTAUX**

Les ARNs totaux sont préparés selon la méthode d'extraction au guanidinium isothiocyanate-phénol (Chomczynski et Sacchi, 1987). Les cellules sont lavées deux fois au PBS 1X, centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes et resuspendues dans 500 µl de solution dénaturante (4 M guanidinium isothiocyanate, 25 mM citrate de sodium pH 7.0, 0.1 M β-mercaptoéthanol et 0.5% N-laurylsarcosine), 0.05 ml d'acétate de sodium 2 M pH 4.0, 0.5 ml de phénol acide saturé dans 0.05 M d'acétate de sodium pH 4.0 et 0.2 ml de chloroforme : alcool isoamylique 24 : 1. Le surnageant est récupéré après une centrifugation à 4°C à 13 000 rpm pendant 30 minutes et l'ARN total est précipité dans 1 ml d'isopropanol à -20°C pendant 30 minutes. Après une centrifugation à 13 000 rpm à 4°C, le culot d'ARN est lavé à l'éthanol 70%, resuspendu finalement dans de l'eau bidistillée stérile et conservé à -80°C jusqu'à l'utilisation pour l'analyse par Northern.

## 2.2 NORTHERN BLOT

La méthode utilisée est celle décrite par Fourney et al. (1988). Les ARNs totaux (20 µg par échantillon) sont chauffés à 65°C pendant 15 minutes, et séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant du tampon MOPS 1X (10 mM acide sulfonique 3-(N-morpholino propane sodium, 50 mM EDTA, 48 mM acétate de sodium) et 5% de formaldéhyde à 70 Volts pendant environ 5 heures. Les ARNs sont transférés par capillarité sur une membrane de Nylon (Nytran, Schleicher and Schuell, ON) placée sur une éponge de 10 cm d'épaisseur (Sambrook et al., 1989) dans une solution de 10 X SSC (1.5 M chlorure de sodium, 150 mM citrate tri-sodique) pendant 16 heures. Après le transfert, la membrane est séchée pendant 2 heures à 80°C dans un four et traitée aux U.V

pendant 2 minutes avec un appareil de fixation d'ADN Fotodyne (BioCan Scientific, ON).

### 2.3 PRÉPARATION DES SONDAS RADIOACTIVES

Les fragments d'ADN de C/EBP  $\alpha$ , C/EBP  $\beta$  et C/EBP  $\delta$  proviennent de vecteurs d'expression obtenus de Steve McKnight (Landschulz et al., 1988; Cao et al., 1991). Le fragment d'ADN de l'haptoglobine a été isolé par RT-PCR à partir d'ARNm du foie de rat. Le fragment d'ADN de l' $\alpha$ -tubuline murine provient de René St-Arnaud (Hôpital Shriners, Montréal) et celui du GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase de rat) provient de Piechaczyk et al. (1987). Après la digestion enzymatique, les fragments d'ADN sont isolés sur gel et purifiés avec la trousse d'isolement de fragment d'ADN Wizard Preps (Promega, WI). Les enzymes de restriction (Pharmacia Biotech. Inc., Québec) sont utilisées selon les recommandations du manufacturier. Les fragments d'ADN sont marqués avec le système d'extension d'amorces Multiprime (Amersham Life Science, CA) en présence de phosphore 32 ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP).

INSERT	LONGEUR	SITE DE RESTRICTION	RÉFÉRENCES
C/EBP $\alpha$	1.8 kb	HindIII, BamHI	Friedman et al., 1989
C/EBP $\beta$	1.5 kb	EcoRI, XhoI	Cao et al., 1991
C/EBP $\delta$	1.0 kb	EcoRI, BamHI	Cao et al., 1991
Haptoglobine	545 pb	HindIII, BamHI	Marinkovic et Baumann, 1990
$\alpha$ - tubuline	1.6 kb	PstI	Lemischka et al., 1981
GAPDH	1.3 kb	PstI	Piechaczyk et al., 1987

## **2.4 PRÉHYBRIDATION ET HYBRIDATION**

La membrane de Nylon est incubée à 65°C durant 4 heures avec agitation dans une solution de préhybridation (0.12 M Tris-HCl pH 7.4, 0.6 M NaCl, 8 mM EDTA, 0.1% pyrophosphate de sodium, 0.1% SDS, 0.06% d'héparine) dans un sac scellé. La membrane est incubée dans la solution d'hybridation (solution de préhybridation contenant 10% de dextran sulfate et 0.625 mg/ml d'héparine) avec la sonde marquée radioactive dans un volume de 6 ml pendant toute la nuit (environ 16- 20 heures). La membrane est ensuite lavée dans une solution de 0.1 X SSC et 0.1% SDS à 65°C pendant 30 minutes avec agitation, et exposée dans une cassette à autoradiographie (FBXC, Fisher Scientific, PA) avec un écran contre un film BioMax (Kodak, NY) à -80°C. L'intensité du signal est quantifiée par densitométrie à l'aide d'un appareil Ultrosan (Pharmacia LKB XL) et normalisées par rapport au contrôle GAPDH ou  $\alpha$ -tubuline.

## **3. EXTRACTION DES PROTÉINES ET ANALYSE PAR WESTERN**

Les cellules IEC-6 sont traitées avec ou sans 1% FBS, en présence ou absence de TGF $\beta$  (5 ng/ml) pendant 10 minutes, 2 heures et 4 heures. Les cellules sont lysées dans 0.4 ml de tampon de lyse (1% Triton, 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 50 mM NaF, 0.2 mM Na orthovanadate, 0.1 mM PMSF, Leupeptine 0.5  $\mu$ g/ml, Pepstatine 0.7  $\mu$ g/ml, 5% glycérol) pendant 15 minutes sur glace et centrifugées 5000 rpm pendant 5 minutes. Les protéines (50  $\mu$ g) sont séparées par



électrophorèse sur gel SDS dénaturant contenant 10% de polyacrylamide (SDS-PAGE) selon la méthode de Laemmli (1970). Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Amersham, ON) à 4°C pendant 4 heures à 220 mA (0.025 M Tris-Cl, 0.192 mM glycine, 10% méthanol). Les protéines sont vérifiées au rouge de ponceau. La membrane est ensuite bloquée à la température de la pièce pendant 1 heure dans du PBS (20 mM Tris-Cl pH 7.6, 137 mM NaCl) contenant 5% de lait écrémé en poudre et 0.05% de Tween-20 (Blotto). L'incubation primaire avec l'anticorps spécifique contre les MAP kinases p42/p44 phosphorylées (1: 500) (New England BioLabs, Mississauga, ON) est effectuée pendant toute la nuit à 4°C. Après 3 lavages de 10 minutes avec du PBS-0.05% Tween-20, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxidase diluée 1 :1000 dans du Blotto (Sigma Chemicals, MO) pendant 1 heure à la température de la pièce. Après 3 lavages de 10 minutes dans du PBS-0.05% Tween-20, les protéines sont révélées pendant 1 minute à l'aide du système ECL (Super Signal Substrate Western Blotting, Pierce, IL) selon le protocole recommandé. La membrane est exposée sur un film à autoradiographie (Amersham, ON) et les signaux émis sont quantifiés par densitométrie avec un appareil Ultroscan (Pharmacia LKB XL).

#### **4. ACTIVITÉ DE LIAISON DES PROTÉINES À L'ADN (GEL DE RÉTENTION)**

##### **4.1 EXTRACTION DES PROTÉINES NUCLÉAIRES**

Les protéines nucléaires sont préparées selon la technique de Stein et al. (1989). Les cellules sont rincées deux fois au PBS 1X et centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes.

Le culot est resuspendu dans 100 µl de tampon de lyse (10 mM 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonate pH 7.9, 1 mM éthylènediamine tétraacétate disodique, 60 mM KCl, 0.5% NP-40, 1 mM dithiothréitol (DTT), 1 mM phénylméthylsulfonyl de fluorure), laissé sur glace pendant 5 minutes et centrifugé pendant 10 secondes à 13 000 rpm à 4°C. Le culot est resuspendu dans 100 µl de tampon de resuspension nucléaire (0.25 M Tris-HCl pH 7.8, 0.06 M KCl, 1 mM DTT, 1.5 mM PMSF) et soumis à trois cycles de congélation dans l'azote liquide et décongélation à 37°C. Après une centrifugation de 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C, le surnageant est récupéré, aliquoté, congelé immédiatement dans l'azote liquide et conservé à -80°C jusqu'à l'utilisation.

## **4.2 PRÉPARATION DES OLIGONUCLÉOTIDES POUR LES SONDÉS RADIOACTIFS**

Des oligonucléotides correspondant aux sites de liaison spécifiques sont marqués au  $^{32}\text{P}$ -dCTP. Les oligonucléotides correspondant aux sites Hapto A, Hapto C et Smad3 comportent des extrémités cohésives comportant un G qui sont marquées par la technique du transfert d'encoche avec  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP et le fragment Klenow de l'ADN polymérase de *E. coli* (Pharmacia, Qué.). Les séquences des oligonucléotides utilisés sont les suivantes: Hapto A, -166 à -145, 5' -CCAAGTATGAAGCAAGAGCTCA-3' (Pajovic et al., 1994); Hapto C, -88 à -67, 5' -GCCGACATTGTGCAAACACAGA-3' (Pajovic et al., 1994); Smad3, 5' -TCGAGAGCCAGACAAGGAGCCAGACAAGGAGCCAGACAC-3' (Dennler et al., 1998).

### 4.3 GEL DE RÉTENTION

Les protéines nucléaires (5- 10  $\mu\text{g}$  ) sont incubées pendant 30 minutes à la température de la pièce dans un volume de 20  $\mu\text{l}$  contenant 2  $\mu\text{l}$  de tampon de rétention 10X (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, 10 mM EDTA, 50% glycérol), 0.25  $\mu\text{g}$  dIdC (Pharmacia, Québec), et 1.0  $\mu\text{l}$  de sonde (20- 50 cps). Après la réaction, les échantillons sont séparés par électrophorèse sur un gel natif de polyacrylamide 4% dans un tampon contenant 0.5 X TBE (45 mM Tris-borate pH 8.0, 40 mM acide borique, 1 mM EDTA) et 2% glycérol pendant 2 heures à 150 Volts avec une pré-électrophorèse d'au moins 30 minutes à 150 Volts (Asselin et al., 1989). Le gel est séché pendant 1 heure et exposé contre un film Biomax (Kodak) à  $-80^{\circ}\text{C}$ . La super-rétention s'effectue en ajoutant des anticorps spécifiques aux facteurs de transcription à l'extrait nucléaire (Sanda Cruz Biotechnology, CA) pour 30 minutes avant d'ajouter la sonde. Les quantités suivantes ont été utilisées pour chaque réaction : anti-C/EBP $\alpha$  (2  $\mu\text{g}$ ), anti-C/EBP $\beta$  (2  $\mu\text{g}$ ), anti-C/EBP $\delta$  (2  $\mu\text{g}$ ), anti-Smad1 (2  $\mu\text{g}$ ), anti-Smad2 (2  $\mu\text{g}$ ) et anti-Smad3 (2  $\mu\text{g}$ ).

Acrylamide	2.4 g
Bisacrylamide	0.064 g
TBE 10X	2.25 ml
Glycérol 50%	2.0 ml
Ammonium persulfate	0.01 g
Eau bidistillée	38.7 ml
TEMED	0.05 ml

## 5. MUTAGÉNÈSE SITE SPÉCIFIQUE DU PROMOTEUR DE L'HAPTOGLOBINE

Une portion de 396 pb du promoteur haptoglobine de rat (-396 à -2) est insérée dans le gène rapporteur luciférase du plasmide pGL3 basic (Promega, WI). Des mutations spécifiques sont introduites aux sites de liaison des facteurs nucléaires C/EBP Hapto A et Hapto C dans le rapporteur Hapto-Luc par mutagénèse dirigée (Bossone et al., 1992). Brièvement, l'ADN simple brin obtenu des bactéries CJ 236 ( $ung^{-}dug^{-}$ ) est contient des uridines (U) au lieu de thymidines (T). Ensuite, après l'hybridation de l'oligonucléotide à l'ADN simple brin, la polymérisation s'effectue avec les 4 nucléotides (A, G, C, T) et la T4 ADN polymérase (Sequenase, Amersham Life Science, CA). L'ADN est ensuite utilisé pour la transformation de cellules compétentes *E. coli*. Les oligonucléotides complémentaires contiennent une séquence de 6 bases reconnues par l'enzyme de restriction Pvu II remplaçant le site de liaison des C/EBPs. La séquence Hapto A :

5' -GCCAAGTATGAAGCAAGAAAGAGCTCAGCTCG -3' (-167 à -140) est modifiée par la séquence Hapto A mutée : 5' -GCCAAGTATGACAGCTGAGCTCAGCTCT -3' et la séquence Hapto C : 5' -AAGGCCGACATTGTGCAAACACAGAAAT -3' (-91 à -64) par la séquence Hapto C mutée : 5' -AAGGCCGACATCAGCTGAACACAGAAAT -3'. Ces changements affectent les séquences consensus de liaison à l'ADN des C/EBPs (Ryden et Beemon, 1989). Ces mutations ont été confirmées par digestion enzymatique et par séquençage.

## 6. TRANSFECTIONS TRANSITOIRES ET ESSAI LUCIFÉRASE

Les transfections transitoires sont réalisées par lipofection (Lipofectin, Gibco-BRL, Burlington, ON). Une portion de 396 pb du promoteur haptoglobine de rat (-396 à -2) est insérée dans le gène rapporteur luciférase du plasmide pGL3 basic (Promega, Madison, WI). Les vecteurs d'expression utilisés sont les suivants : RSV, RSV/*ras* N17 (dominant négatif de *ras* restant sous la forme *ras*-GDP) (fourni par le Dr. Richard Pestell); CMV5, CMV5/Smad2, CMV5/Smad3 (proviennent du laboratoire du Dr. Liliana Attisano, université de Toronto); MSV, MSV/C/EBP $\alpha$ , MSV/C/EBP $\beta$ , and MSV/C/EBP $\delta$  (fourni par le Dr. Steve McKnight). D'abord, la lipofectine est incubée dans un milieu Opti-MEM à la température de la pièce pendant 1 heure. Les transfections sont réalisées dans des boîtes de 24 puits. 50  $\mu$ l de Opti-MEM contenant 0.1  $\mu$ g d'ADN de gène rapporteur avec ou sans 0.1  $\mu$ g de vecteur d'expression sont combinés à 50  $\mu$ l de Opti-MEM contenant la lipofectine 1  $\mu$ l par puits pendant 15 minutes à la température de la pièce. Après cette incubation, le volume est complété à 300  $\mu$ l avec l'ajout de 200  $\mu$ l Opti-MEM. Les cellules IEC-6 sont lavées au DMEM sans sérum et incubées avec le complexe ADN -lipofectine pendant 7 heures. Le vecteur pRL-SV40 renilla luciférase (Promega, Madison, WI) est utilisé comme contrôle pour l'efficacité de transfection. Par la suite, le milieu est remplacé par du milieu contenant 5% FBS en absence ou en présence de TGF $\beta$  (5 ng/ml) et dexaméthasone ( $10^{-6}$  M). Après 24 heures d'incubation, les cellules sont lysées avec 300  $\mu$ l d'un tampon de lyse (25 mM glycylglycine, 15 mM MgSO $_4$ , 4 mM EGTA, 1% Triton X-100, et 1 mM DTT), et mélangées à 100  $\mu$ l d'un tampon contenant de l'ATP (Sigma Chemicals, MO) (25 mM glycylglycine, 15 mM

MgSO<sub>4</sub>, 4 mM EGTA, 15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 mM ATP et 3 mM DTT) et 100 µl d'une solution de luciférine (1 mM) (Molecular Probes, OR). L'activité luciférase est mesurée pendant 20 secondes dans un luminomètre de type Lumat LB 9507 (EG&G Berthold, USA). Chaque expérience est répétée au moins trois fois en duplicata.

## **7. ANALYSES STATISTIQUES**

Les études statistiques sont réalisées avec un test 't' de student pairé à une direction. Elles sont représentées par une moyenne accompagnée de l'erreur standard. Les différences statistiques sont fixées à une limite de 95% ( $p < 0.05$ ).

### III. RÉSULTATS

#### 1. ATTÉNUATION PAR LE TGF $\beta$ DE L'EXPRESSION DU GÈNE HAPTOGLOBINE, DE C/EBP $\beta$ ET DE C/EBP $\delta$ INDUITE PAR LA DEXAMÉTHASONE

Pour vérifier si le TGF $\beta$  peut affecter l'expression du gène de réponse inflammatoire haptoglobine et les facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  dans les cellules épithéliales intestinales, nous avons étudié dans un premier temps l'expression de ceux-ci par analyse Northern en présence de la dexaméthasone et de TGF $\beta$ . Nous avons observé que le traitement des cellules IEC-6 par la dexaméthasone entraîne une augmentation de l'expression de l'haptoglobine au niveau de l'ARNm de 4.5 fois par rapport au contrôle ( $p \leq 0.001$ ), tandis que le traitement par le TGF $\beta$  abolit l'effet de la dexaméthasone après 24 heures (Figure 2). La dexaméthasone induit l'expression de C/EBP $\beta$  et de C/EBP $\delta$  respectivement 3 fois et 7 fois ( $p < 0.005$ ) après 4 heures de traitement à la dexaméthasone, alors que l'addition de TGF $\beta$  atténue cette induction (Figure 3). Le TGF $\beta$  diminue significativement les niveaux non-induits des ARNm de C/EBP $\delta$ .

Nous avons ensuite vérifié si les variations au niveau de l'ARNm de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  par la dexaméthasone et le TGF $\beta$  entraînaient des modifications dans la capacité des protéines C/EBPs à lier l'ADN. Le promoteur proximal du gène haptoglobine de rat contient deux sites C/EBPs, Hapto A (-166 à -145) et Hapto C (-88 à -67), identifiés à

l'aide d'extraits nucléaires de foie de rat (Pajovic et al., 1994). Des extraits de protéines nucléaires des cellules IEC-6 traitées avec ou sans la dexaméthasone et le TGF $\beta$  ont été mélangés avec des oligonucléotides marqués au  $^{32}\text{P}$  et représentant le site d'interaction des C/EBPs Hapto A. Par gel de rétention, nous avons observé que la dexaméthasone induit fortement la capacité de liaison au site Hapto A après 2 h (Figure 4A). Cette induction est maintenue jusqu'à 8 h. L'addition de TGF $\beta$  réduit significativement la capacité de liaison induite par la dexaméthasone (Figure 4A). En ajoutant des anticorps contre les isoformes C/EBP $\beta$  ou C/EBP $\delta$  dans les extraits nucléaires avant d'ajouter la sonde Hapto A, nous avons démontré que la dexaméthasone induit les isoformes C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  (Figure 4B) alors que le TGF $\beta$  atténue la capacité de liaison des 2 isoformes à lier le site Hapto A (Figure 4C). Des résultats semblables ont été obtenus avec le site Hapto C (non montrés). Ces résultats suggèrent une corrélation étroite entre la régulation négative de l'expression du gène haptoglobine et la diminution de la capacité des facteurs de transcription C/EBPs à lier l'ADN en réponse au TGF $\beta$ .

Nous avons précédemment démontré que les C/EBPs étaient impliqués dans la régulation positive de l'haptoglobine par l'AMPc dans les cellules IEC-6 (Pelletier et al., 1998). Nous avons donc vérifié si les sites d'interaction Hapto A et Hapto C dans le promoteur proximal de l'haptoglobine étaient directement impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'haptoglobine suite à un traitement à la dexaméthasone et au TGF $\beta$ . Une mutagénèse site-spécifique (Bossone et al., 1992) des deux sites de liaison Hapto A et Hapto C a été effectuée sur une portion du promoteur de l'haptoglobine de rat (-396 à –



2) cloné dans le vecteur d'expression de la luciférase, pGL3 basic (Hapto-Luc) (Figure 5).

Nous avons évalué par transfection transitoire et essai luciférase l'effet de la dexaméthasone et du TGF $\beta$  sur l'expression du vecteur Hapto-Luc et du double mutant Hapto AC-Luc. La dexaméthasone induit l'activité du promoteur haptoglobine jusqu'à 4.1 fois par rapport au contrôle ( $p \leq 0.01$ ). Le TGF $\beta$  atténue l'activité du promoteur haptoglobine 2.6 fois par rapport au contrôle en absence de la dexaméthasone ( $p < 0.01$ ) (Figure 6A). De plus, le TGF $\beta$  atténue l'activité du promoteur haptoglobine induit par la dexaméthasone jusqu'à 2.3 fois ( $p \leq 0.05$ ). L'inactivation des sites d'interaction Hapto A et Hapto C réduit le niveau d'expression de base de 7 fois par rapport à Hapto-Luc ( $p < 0.005$ ). La mutation de ces deux sites abolit à la fois l'induction par la dexaméthasone et l'atténuation par le TGF $\beta$  (Figure 6B). Ces résultats suggèrent que les sites Hapto A et Hapto C du promoteur de l'haptoglobine sont très importants dans la régulation de ce gène dans les cellules intestinales épithéliales. De plus, les facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  sont essentiels à la régulation de l'expression de l'haptoglobine en réponse à la dexaméthasone et au TGF $\beta$ . Le TGF $\beta$  atténuerait l'expression du gène haptoglobine par une régulation négative des facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$ .

## **2. DÉTERMINATION DES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS L'ATTÉNUATION DE L'EXPRESSION DE L'HAPTOGLOBINE PAR LE TGF $\beta$**

Afin de déterminer les voies de signalisation impliquées dans l'atténuation de l'expression de l'haptoglobine par le TGF $\beta$  dans les cellules IEC-6, nous avons d'abord vérifié si le TGF $\beta$  pouvait induire l'activité de différentes kinases (p42/p44, p38, JNK) par Western en utilisant des anticorps contre les formes phosphorylées et actives. Alors que p38 et JNK ne sont pas affectés par le TGF $\beta$  dans les cellules IEC-6 (non montrés), nous avons observé que le TGF $\beta$  active les isoformes p42/p44 rapidement après 10 minutes (Figure 7). Cette induction est réduite mais maintenue jusqu'à 4 heures. Comme contrôle, le sérum entraîne une induction très forte et biphasique (10 min et 4 h) de l'activité de p42/p44. De plus, un effet d'activation additif entre le TGF $\beta$  et le sérum est observé jusqu'à 4 h. Puisque le TGF $\beta$  induit p42/p44, nous avons vérifié l'effet d'un inhibiteur spécifique des MAP kinase kinases (MEKs1/2), le PD98059, sur l'expression du rapporteur Hapto-Luc par transfection transitoire en présence ou en absence de TGF $\beta$ . Le PD98059 (20  $\mu$ M, cette concentration inhibe l'activation des MAPKs p42/p44 par le sérum ou le TGF $\beta$ ) augmente légèrement le niveau d'expression du promoteur de l'haptoglobine ( $p \leq 0.001$ ) (Figure 8). Alors que le TGF $\beta$  atténue près de 4 fois l'expression de Hapto-Luc, le PD98059 (20  $\mu$ M) abolit complètement cet effet ( $p \leq 0.001$ ) (Figure 8). Ces résultats montrent que le TGF $\beta$  induit les MAP kinases p42/p44 dans les cellules IEC-6, et que les MAP kinases p42/p44 jouent un rôle important dans l'effet atténuateur du TGF $\beta$ .

Il a été démontré que *ras* se retrouve en amont de la voie de signalisation empruntant les MAP kinases p42/p44. Nous avons vérifié par transfection transitoire et essai luciférase

en co-transfectant un *ras* dominant négatif (*rasN17*) si *ras* pouvait affecter l'expression de Hapto-Luc. Nous avons observé que *rasN* augmente l'activité du promoteur haptoglobine 2.7 fois ( $p < 0.05$ ) (Figure 9). Ces résultats suggèrent que l'atténuation de l'expression du gène haptoglobine par le TGF $\beta$  dans les cellules IEC-6 dépend en partie de la voie des MAP kinases p42/p44, et que la protéine *ras* est impliquée.

Enfin, afin de déterminer si les protéines Smads (facteurs de transcription induits directement par le TGF $\beta$ ) pouvaient être impliquées dans l'atténuation de l'expression de l'haptoglobine médiée par le TGF $\beta$ , nous avons transfecté les vecteurs d'expression contenant Smad2 et Smad3 (CMV-Smad2, CMV-Smad3) et le rapporteur Hapto-Luc dans les cellules IEC-6. Alors que Smad3 diminue l'expression du promoteur haptoglobine 3.3 fois par rapport au contrôle ( $p < 0.01$ ), Smad2 n'a pas d'effet (Figure 10). Nous avons ensuite vérifié l'action de Smad3 sur l'induction de Hapto-Luc dépendante des C/EBPs par co-transfection. C/EBP $\alpha$  augmente de 4.3 fois l'expression de Hapto-Luc ( $p < 0.005$ ), alors que C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  induisent respectivement 2 fois et 1.7 fois ( $p < 0.01$ ). L'addition de Smad3 diminue fortement l'expression de Hapto-Luc induite par les C/EBPs ( $p < 0.005$ ) (Figure 11). Nous avons finalement vérifié l'induction des Smads par le TGF $\beta$  dans les cellules IEC-6 par gel de rétention avec un site Smad3 (Dennler et al., 1998). Nous avons observé que le TGF $\beta$  active de façon très rapide la liaison de Smad3 (Figure 12). Il est intéressant de constater que la liaison de Smad1 est aussi induite, alors que celle de Smad2 ne l'est pas (non montré). Ces résultats suggèrent que la protéine Smad3 pourrait être impliquée dans le processus d'atténuation de l'expression de l'haptoglobine par le TGF $\beta$ .

**Figure 2. Inhibition par le TGF $\beta$  des niveaux d'ARNm du gène haptoglobine induits par la dexaméthasone dans les cellules IEC-6.**

Les ARNs totaux sont extraits des cellules IEC-6 traitées ou non-traitées pendant 24 heures avec de la dexaméthasone ( $10^{-6}$  M), du TGF $\beta$  (5 ng/ml), ou les deux (dexa + TGF $\beta$ ). Les ARNs sont séparés par électrophorèse, transférés sur membrane et hybridés avec une sonde haptoglobine marquée au  $^{32}\text{P}$ . La membrane est rehybridée avec la sonde  $\alpha$ -tubuline, afin de normaliser les quantités relatives d'ARN dans chaque puits.

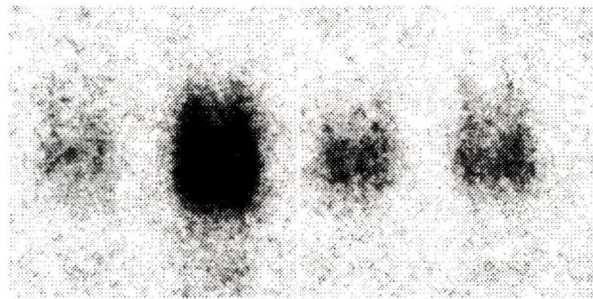
HAPTO

Contrôle

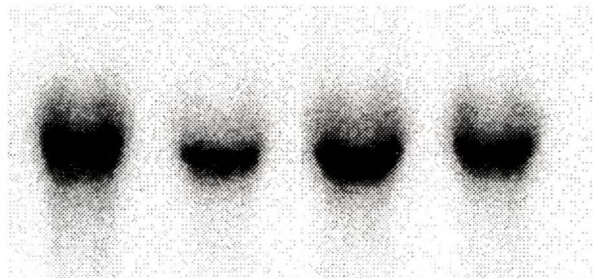
Dexa

TGF $\beta$

Dexa + TGF $\beta$



$\alpha$ -tubuline

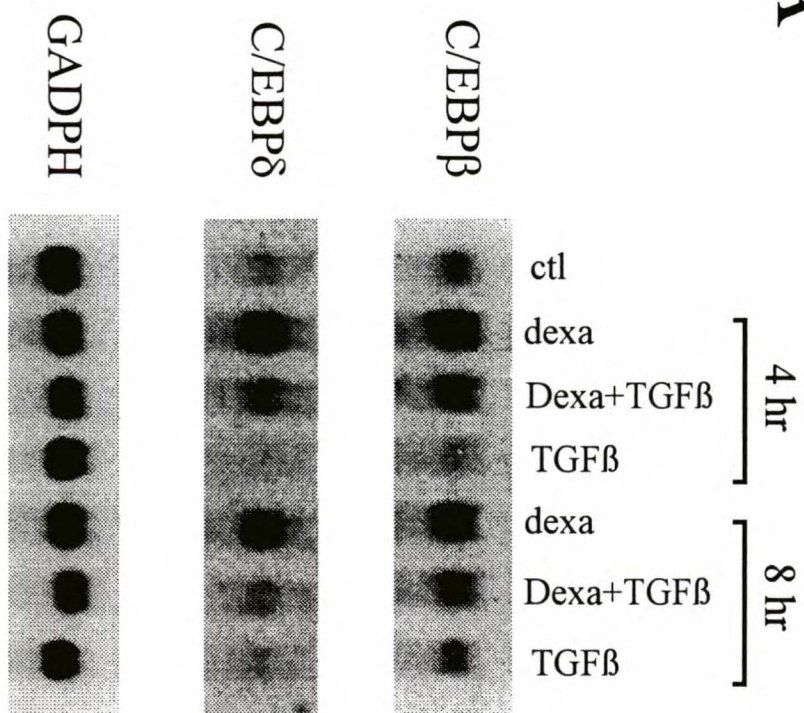


**Figure 3. Inhibition par le TGF $\beta$  des niveaux d'ARNm des facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  induits par la dexaméthasone dans les cellules IEC-6.**

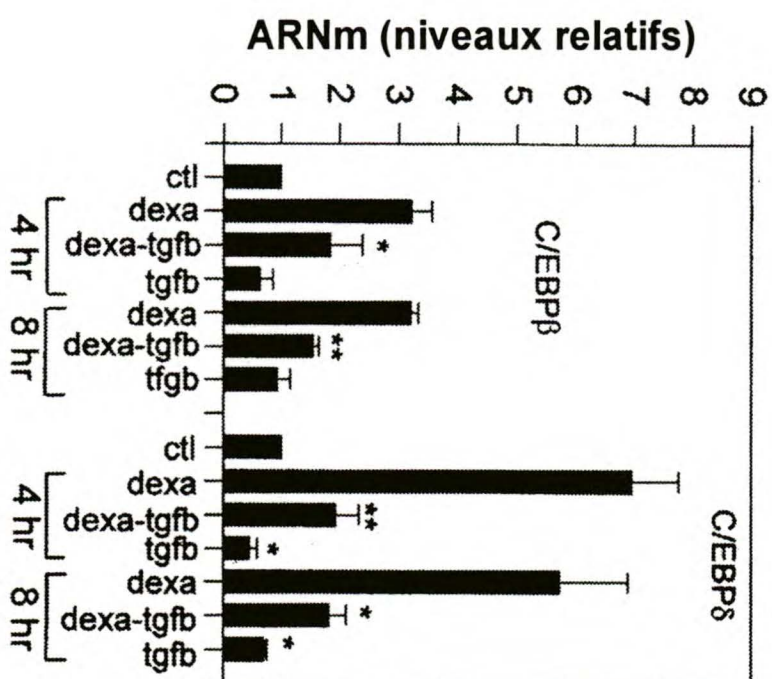
**A:** Les ARNs totaux sont extraits des cellules IEC-6 après 4 ou 8 heures de traitement avec la dexaméthasone (Dexa) ( $10^{-6}$  M) et/ou le TGF $\beta$  (5 ng/ml). Les ARNs sont séparés par électrophorèse, transférés sur membrane, et hybridés avec une sonde C/EBP  $\beta$ , C/EBP  $\delta$  et GAPDH marquée au  $^{32}\text{P}$ . La sonde GAPDH utilisée permet de normaliser les quantités relatives d'ARN dans chaque puits.

**B:** Les niveaux d'ARNm des isoformes C/EBPs ont été quantifiés par analyse densitométrique en comparaison avec le contrôle GAPDH. Les valeurs moyennes  $\pm$  SE sont calculées à l'aide de 3 expériences indépendantes.

A



B



**Figure 4. Atténuation par le TGF $\beta$  de la capacité des complexes C/EBP à lier l'ADN.**

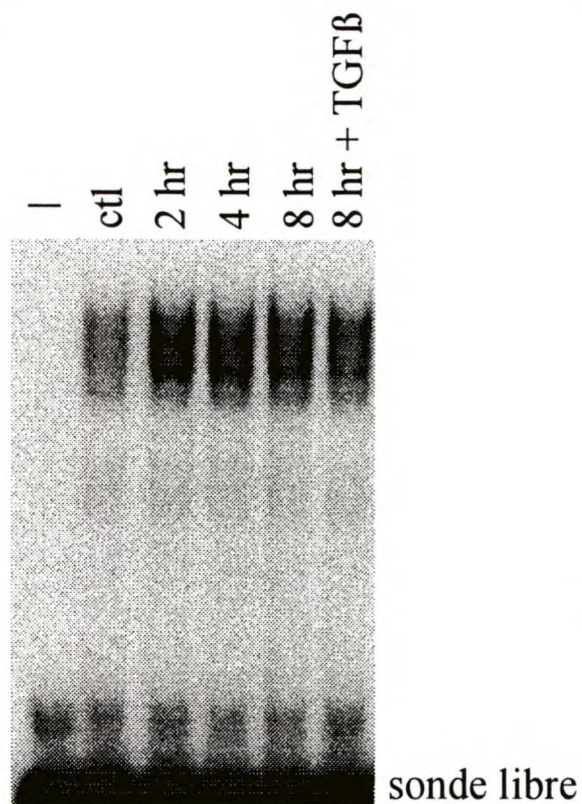
**A :** Les extraits nucléaires des cellules IEC-6 non-traitées (ctl) ou traitées avec la dexaméthasone pendant 2, 4 et 8 heures, ou avec  $10^{-6}$  M de dexaméthasone et 5 ng/ml de TGF $\beta$  pendant 8 heures, sont mélangés à un oligonucléotide marqué au  $^{32}\text{P}$  correspondant au site de liaison spécifique Hapto A. Les complexes ainsi formés sont séparés de la sonde libre sur un gel d'acrylamide natif.

**B :** Les extraits nucléaires des cellules IEC-6 obtenus en absence de la dexaméthasone (ctl) ou en présence de la dexaméthasone pendant 8 heures sont incubés en absence ou en présence des anticorps spécifiques aux isoformes C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , et C/EBP $\delta$  pendant 30 minutes avant d'ajouter la sonde Hapto A marquée au  $^{32}\text{P}$ .

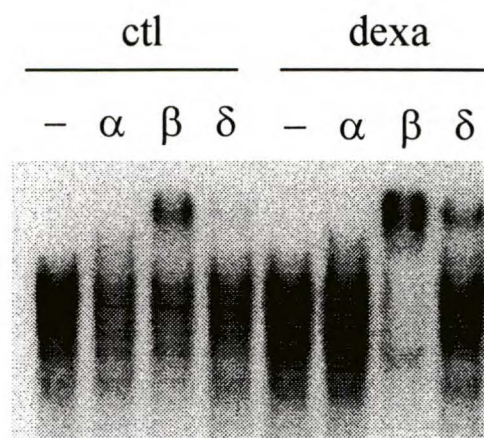
**C :** Les extraits nucléaires des cellules IEC-6 traitées avec la dexaméthasone avec ou sans TGF $\beta$  sont incubés en absence ou en présence des anticorps spécifiques aux isoformes C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , et C/EBP $\delta$  pendant 30 minutes avant d'ajouter la sonde Hapto A marquée au  $^{32}\text{P}$ .



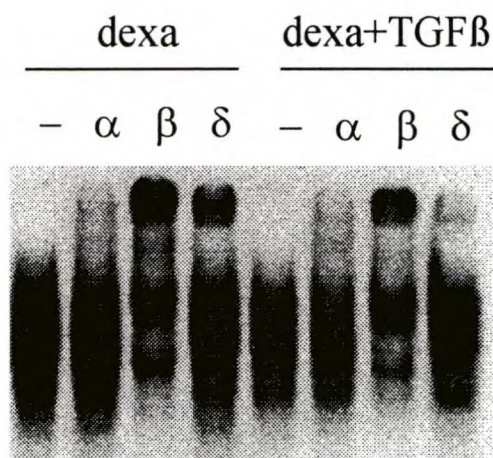
A



B



C



**Figure 5. Mutagénèse des sites Hapto A et Hapto C du promoteur de l'haptoglobine.**

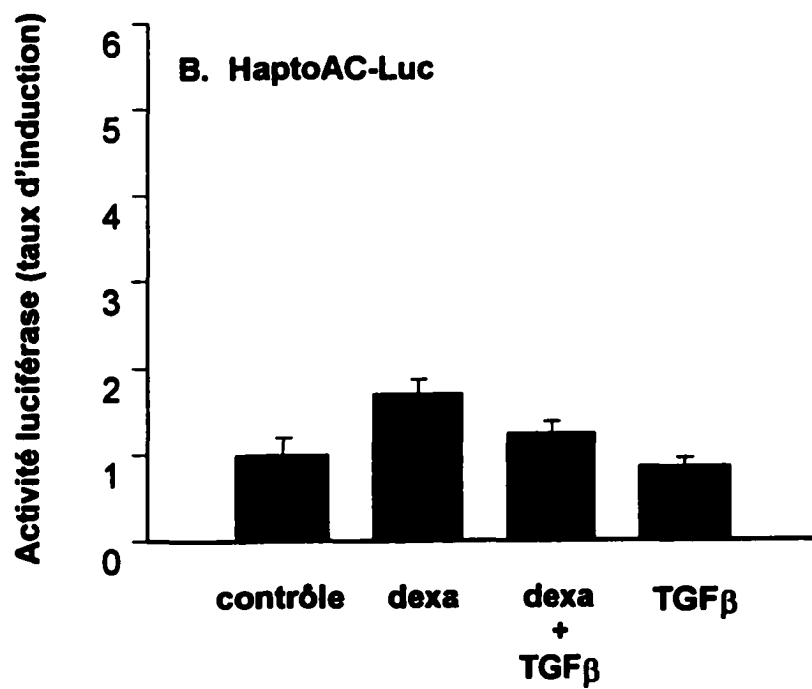
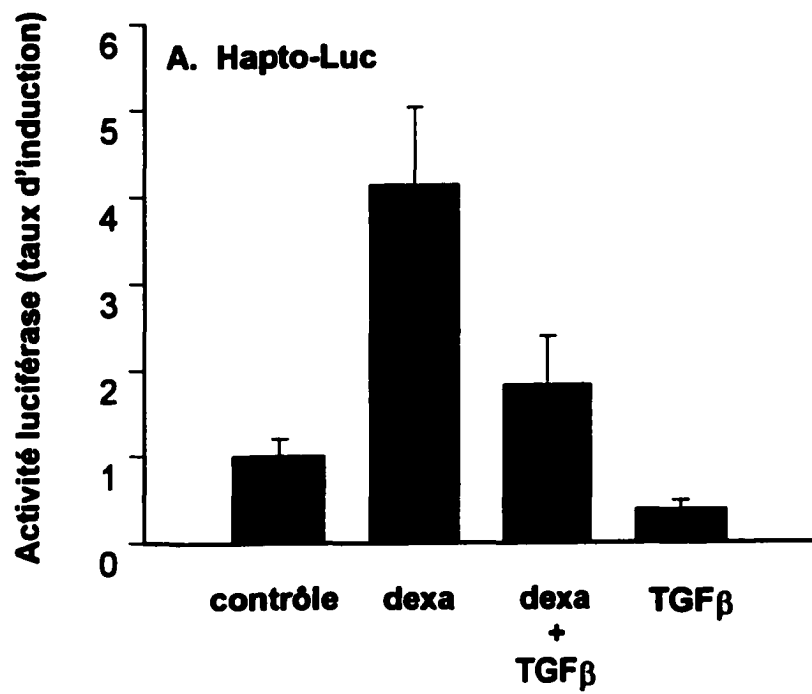
Une portion de 396 pb du promoteur de l'haptoglobine de rat a été insérée dans le plasmide pGL3 basic contenant le gène rapporteur luciférase (Promega, WI). La construction du mutant Hapto AC a été obtenue par mutagénèse dirigée (Bossonne et al., 1992) en remplaçant 6 bases des sites Hapto A et Hapto C (sites de liaison des C/EBPs) par 6 bases reconnues par les enzymes de restriction Pvu II ou Nde I. Ces mutants ont été confirmés par digestion enzymatique avec Pvu II et Nde I, et par séquençage.

# Mutagenèse des sites **Hapto A** et **Hapto C** du promoteur de l'haptoglobine

Hapto A	Hapto B	Hapto C
TATGA <b>AGCAAG</b> CAGCTC	GGTTA <b>CTGGAA</b> CAGTC	GACAT <b>TGTGCA</b> AACAC
↓ mtA	↓ mtB	↓ mtC
TATGA <b>CAGCTG</b> CAGCTC	GGTTA <b>GATATC</b> CAGTC	GACAT <b>CATATG</b> AACAC

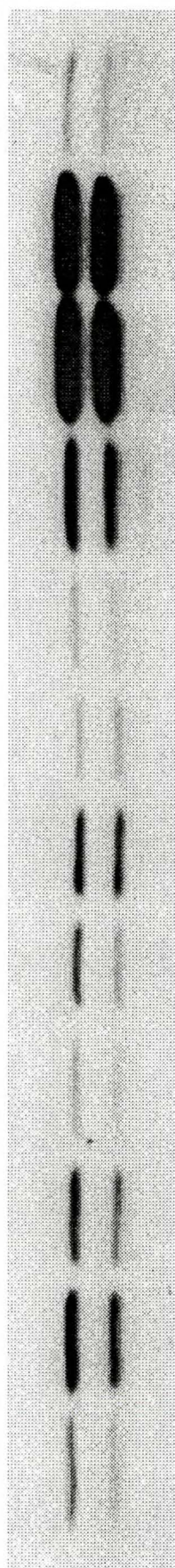
**Figure 6. La mutation des sites d'interaction Hapto A et Hapto C du promoteur du gène de l'haptoglobine abolit la réponse à la dexaméthasone et au TGFβ.**

Les cellules IEC-6 sont transfectées par lipofection avec le gène rapporteur de type sauvage Hapto-Luc, et le double mutant Hapto AC-Luc en présence ou en absence de la dexaméthasone ( $10^{-6}$ M), TGFβ (5 ng/ml) ou une combinaison des deux. L'activité luciférase est comparée à celle du contrôle de transfection renilla luciférase (Promega) et exprimée en niveau d'induction par rapport à l'activité du contrôle. Les moyennes  $\pm$  S.E. sont calculées avec les valeurs obtenues de quatre expériences indépendantes effectuées chaque fois en duplicata.



**Figure 7. Stimulation de l'activité des MAP kinases p42/p44 par le TGF $\beta$  dans les cellules IEC-6.**

Les cellules sont incubées avec le milieu sans sérum pendant 24 heures avant d'être stimulées pendant 10 minutes, 2 heures et 4 heures avec 1% FBS, 5 ng/ml TGF $\beta$  ou une combinaison des deux. Les extraits protéiques sont séparés par SDS-PAGE et transférés sur une membrane de nitrocellulose pour une analyse Western avec des anticorps spécifiques aux isoformes p42/p44 phosphorylées. Suite à l'incubation avec un anticorps secondaire lié à la peroxidase, les signaux sont détectés avec la trousse de révélation Super Signal Substrate Western Blotting (Pierce) sur un film à autoradiographie (Amersham, ON).



**Control**

**1% FBS**

**1% FBS + TGFβ**

**TGFβ**

**Control**

**1% FBS**

**1% FBS + TGFβ**

**TGFβ**

**Control**

**1% FBS**

**1% FBS + TGFβ**

**TGFβ**

**10 min**

**2 hrs**

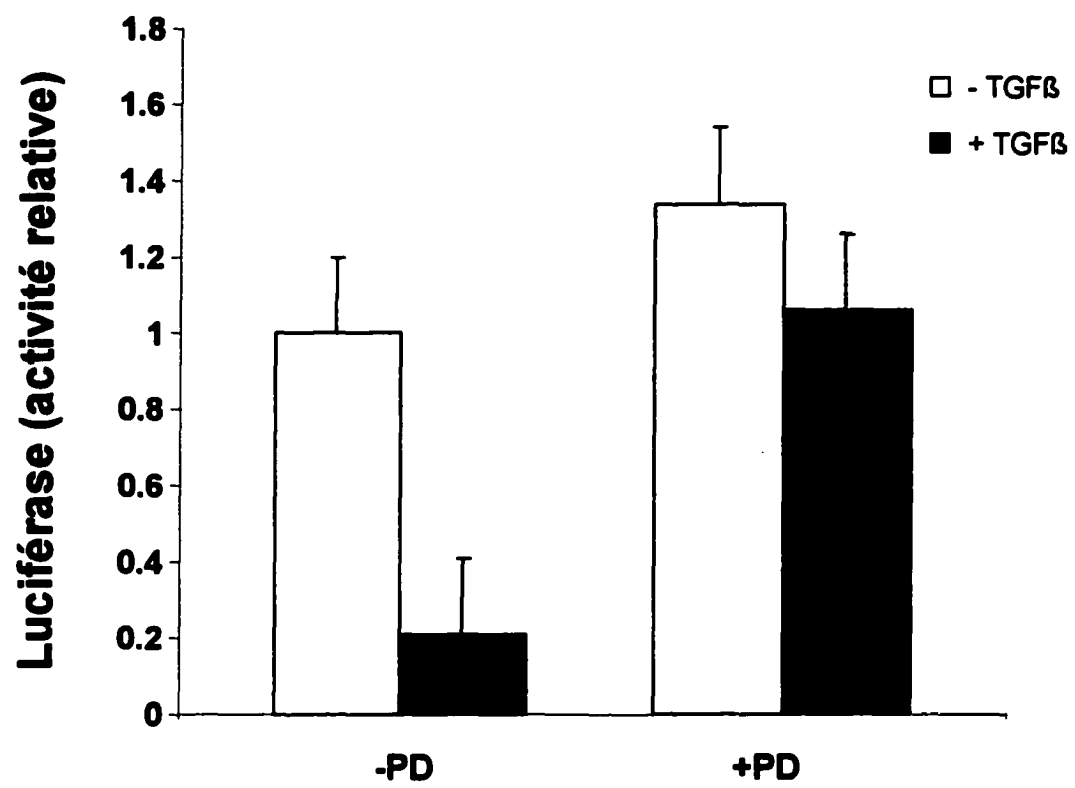
**4 hrs**

- p44  
- p42

**Figure 8. Le PD98059, un inhibiteur de MAPKKs (MEKs1/2), inhibe l'atténuation de l'expression de l'haptoglobine par le TGF $\beta$ .**

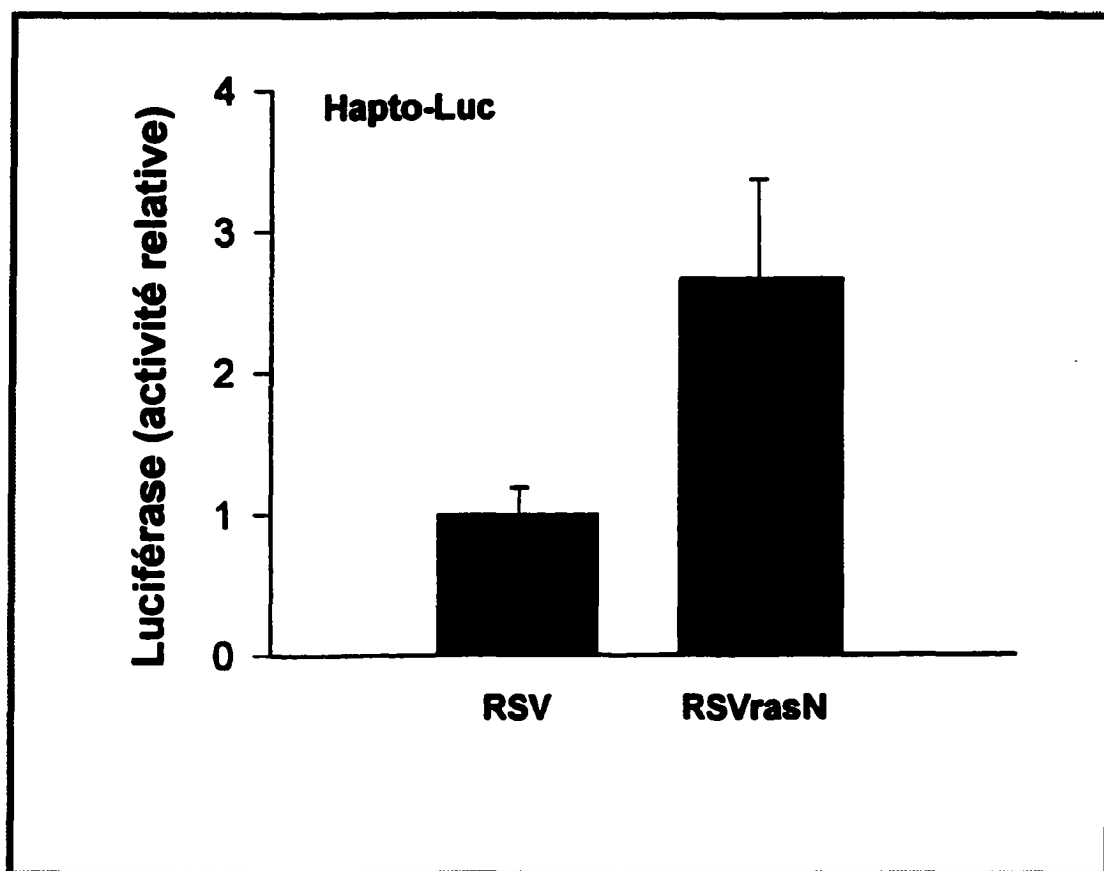
Les cellules IEC-6 sont transfectées avec le gène rapporteur Hapto-Luc par lipofection. Après 7 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont traitées avec le PD98059 (20  $\mu$ M), un inhibiteur de MEKs1/2, pendant 24 heures en présence ou en absence de TGF $\beta$  (5 ng/ml). L'activité luciférase est comparée à celle du contrôle de transfection renilla luciférase (Promega) et exprimée en niveau d'induction par rapport à l'activité des cellules non-traitées. Les moyennes  $\pm$  S.E. sont calculées avec les valeurs obtenues de quatre expériences indépendantes effectuées chaque fois en duplicata.





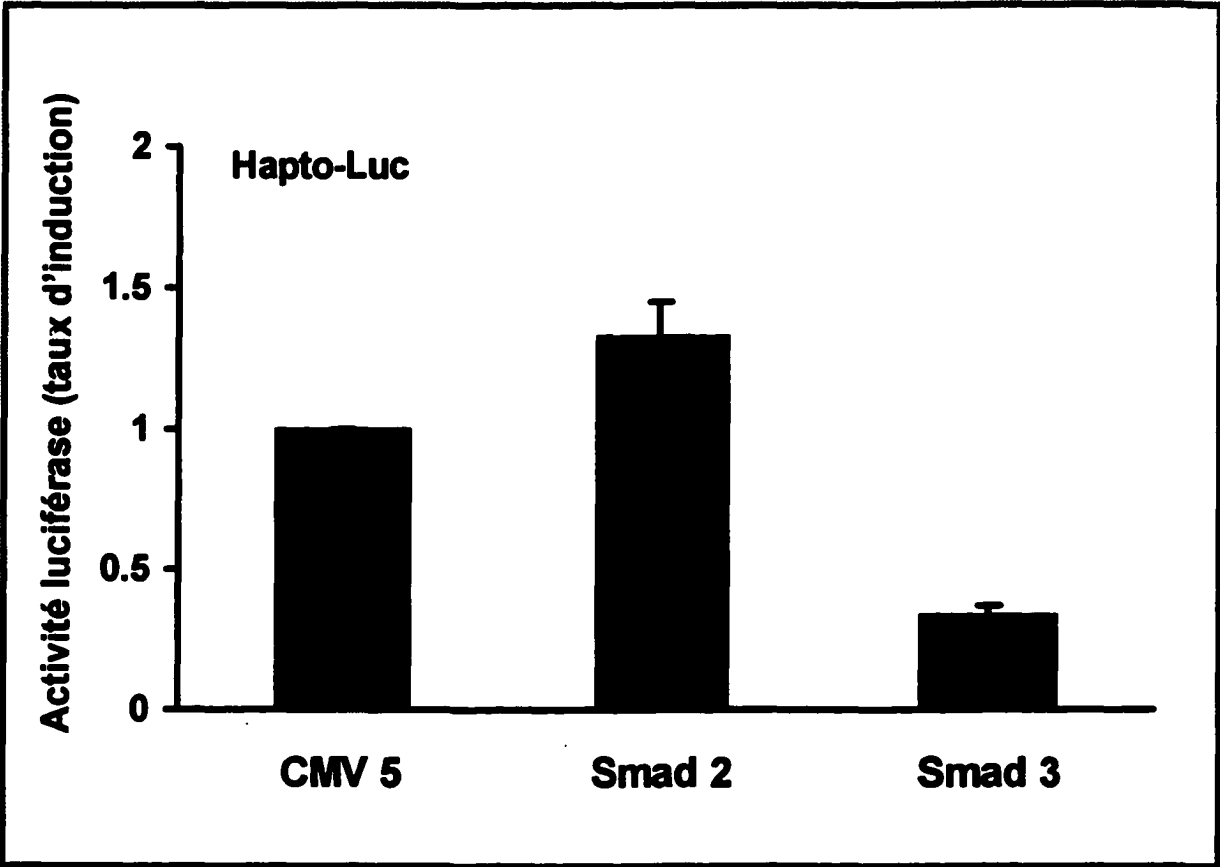
**Figure 9. Un dominant négatif de *ras*, *rasN*, augmente l'activité du promoteur de l'haptoglobine.**

Les cellules sont co-transfectées par lipofection avec le gène rapporteur Hapto-Luc et le vecteur d'expression RSV avec ou sans le dominant négatif de *ras*, *rasN17*. L'activité luciférase est comparée à celle du contrôle de transfection renilla luciférase (Promega) et exprimée en niveau d'induction par rapport à l'activité du contrôle RSV. Les moyennes  $\pm$  S.E. sont calculées avec les valeurs obtenues de quatre expériences indépendantes effectuées chaque fois en duplicata.



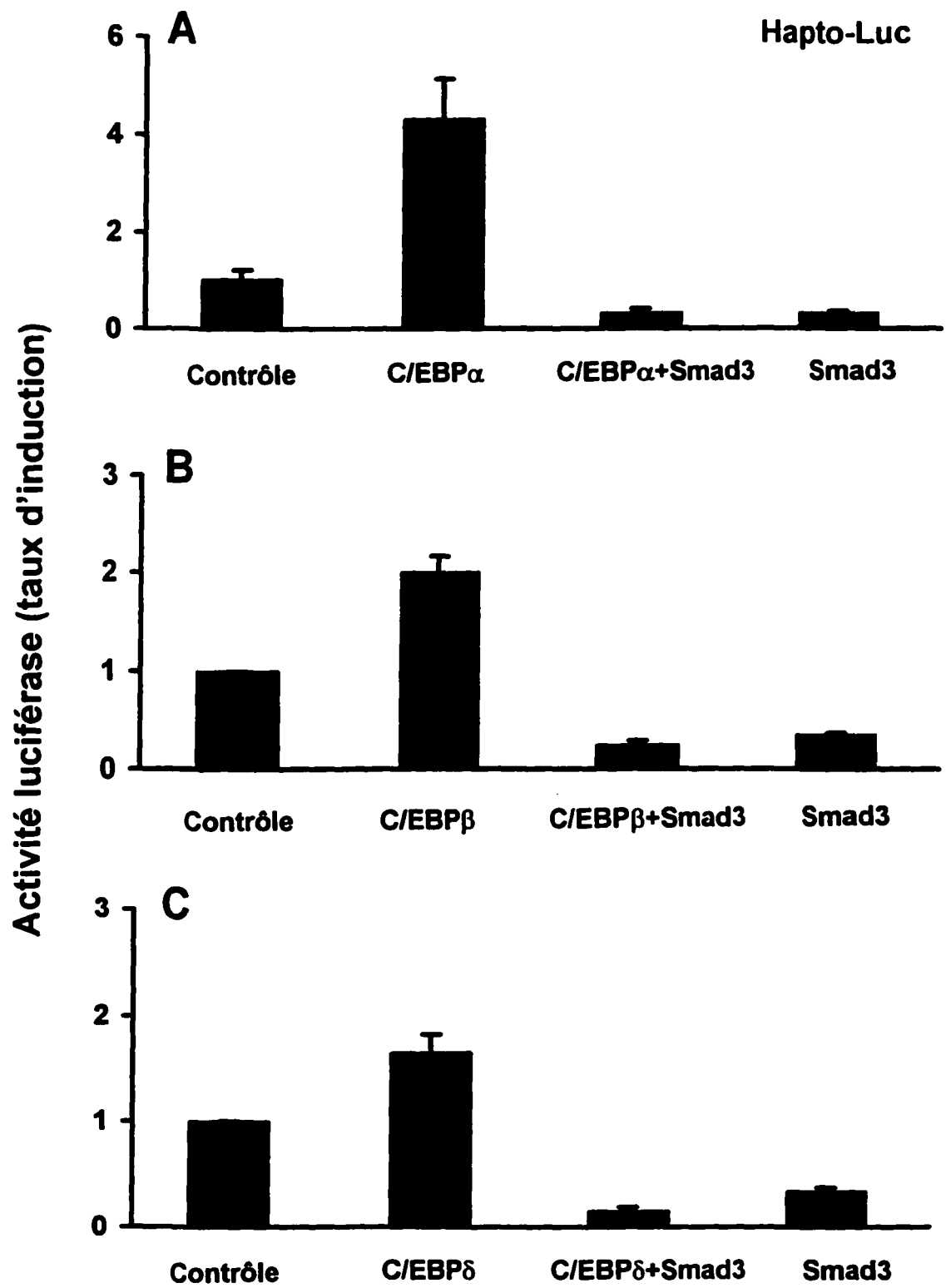
**Figure 10. Smad3 inhibe l'activité du promoteur de l'haptoglobine.**

Les cellules sont co-transfectées par lipofection avec le gène rapporteur Hapto-Luc et les vecteurs d'expression sans (CMV5) ou avec les séquences des facteurs de transcription Smad2 et Smad3. L'activité luciférase est comparée à celle du contrôle de transfection renilla luciférase (Promega) et exprimée en niveau d'induction par rapport à l'activité du contrôle CMV5. Les moyennes  $\pm$  S.E. sont calculées avec les valeurs obtenues de quatre expériences indépendantes effectuées chaque fois en duplicata.



**Figure 11. Smad3 inhibe l'activation du promoteur de l'haptoglobine par les isoformes C/EBP.**

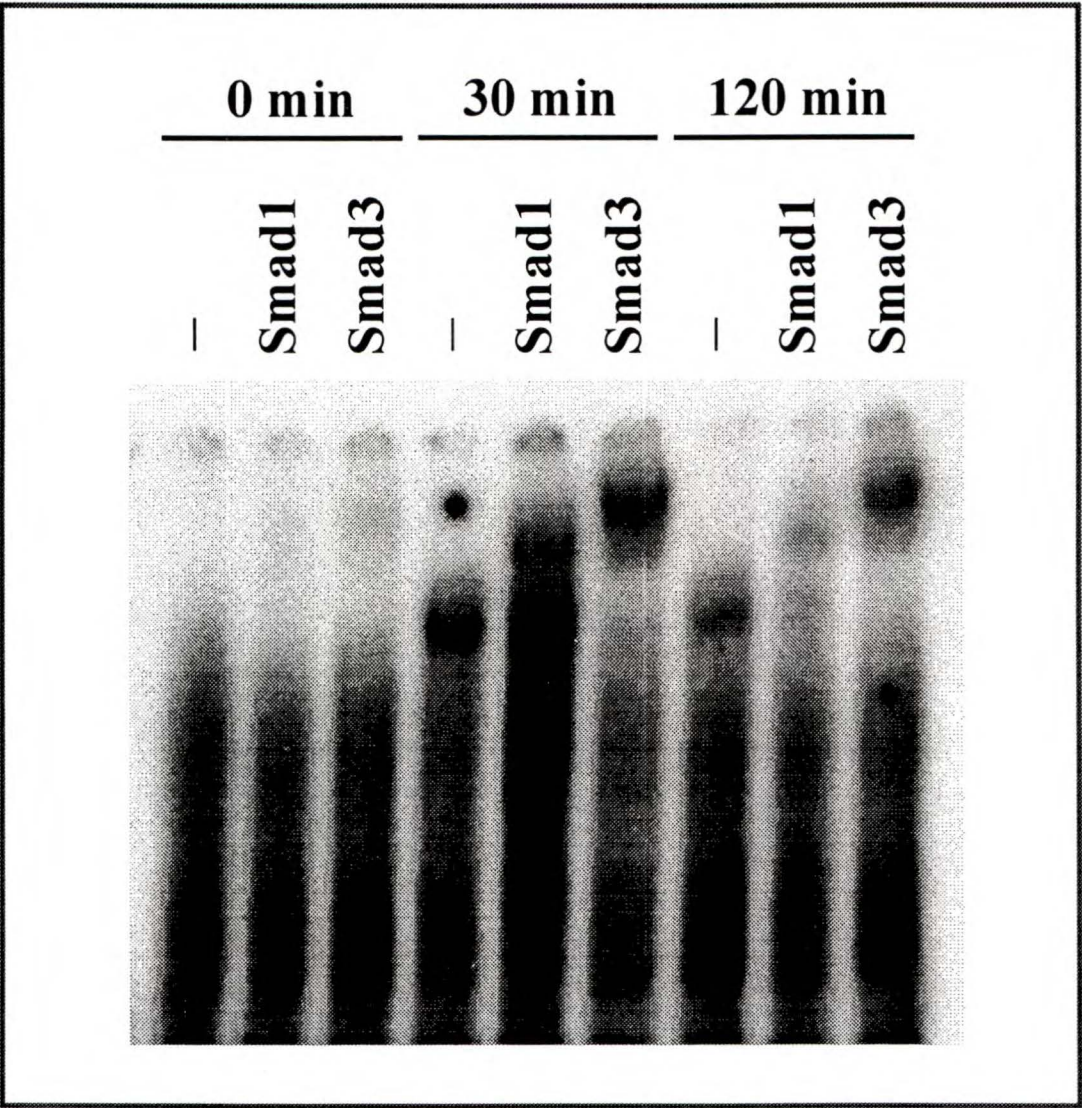
Les cellules IEC-6 sont co-transfectées par lipofection avec le gène rapporteur Hapto-Luc, et les vecteurs d'expression MSV (contrôle), MSV-C/EBP $\alpha$ , MSV-C/EBP $\beta$ , MSV-C/EBP $\delta$  et CMV5 ou CMV5-Smad3. L'activité luciférase est comparée à celle du contrôle de transfection renilla luciférase (Promega) et exprimée en niveau d'induction par rapport à l'activité du contrôle MSV-CMV5. Les moyennes  $\pm$  S.E. sont calculées avec les valeurs obtenues de quatre expériences indépendantes effectuées chaque fois en duplicata.



**Figure 12. Induction de la capacité de liaison de Smad1 et Smad3 par le TGF $\beta$ .**

Les extraits nucléaires sont préparés après 0, 30 minutes et 2 heures de traitement au TGF $\beta$  (5 ng/ml), et mélangés à un oligonucléotide marqué au  $^{32}\text{P}$  contenant le site de liaison à Smad3 en absence (-) ou en présence d'anticorps spécifiques à Smad1 et Smad3. Les complexes ainsi formés sont séparés de la sonde libre sur un gel d'acrylamide natif.





## IV. DISCUSSION

### 1. LES C/EBPS SONT IMPLIQUÉS À LA FOIS DANS L'INDUCTION PAR LES GLUCOCORTICOÏDES ET L'ATTÉNUATION PAR LE TGF $\beta$ DE L'HAPTOGLOBINE

Nous avons observé que dans les cellules IEC-6, le gène APP haptoglobine est induit par la dexaméthasone. Le TGF $\beta$  atténue l'expression de l'haptoglobine induit par la dexaméthasone. Nous avons observé une corrélation étroite entre l'induction de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  et celle de l'haptoglobine par la dexaméthasone, et l'atténuation de l'expression de ceux-ci par le TGF $\beta$ , au niveau de l'ARNm. L'effet de la dexaméthasone résulte en une augmentation de la capacité de liaison de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  aux sites Hapto A et Hapto C du promoteur de l'haptoglobine alors que l'effet du TGF $\beta$  mène à une atténuation de la capacité de liaison. Des mutations des sites Hapto A et Hapto C abolissent à la fois l'induction par la dexaméthasone et l'atténuation par le TGF $\beta$  du promoteur de l'haptoglobine. Ces sites d'interaction sont importants puisqu'une mutation du site Hapto B liant les facteurs de transcription STATs est sans effet (non montré).

Nous avons démontré que le gène haptoglobine est induit par la dexaméthasone dans les cellules intestinales épithéliales de rat. Les gènes APPs de type I, dont fait partie l'haptoglobine, sont aussi induits par les glucocorticoïdes dans les hépatocytes. Les glucocorticoïdes sont des modulateurs importants de la réponse inflammatoire de l'organisme (Baumann et Gauldie, 1994). La régulation des gènes APPs par la

dexaméthasone est surtout transcriptionnelle. Cette régulation est soit directe, par le récepteur lié à son ligand, soit indirecte par des interactions entre le récepteur et d'autres facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B et AP-1, ou par induction de l'expression d'autres facteurs (Koj, 1996). Il n'y a pas de site de liaison du récepteur des glucocorticoïdes dans le promoteur de l'haptoglobine. Donc, l'effet des glucocorticoïdes est indirect. Nos travaux démontrent une régulation positive des glucocorticoïdes sur l'expression des niveaux d'ARNm des isoformes C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$ . Nos résultats suggèrent une contribution importante de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  dans l'induction de l'expression de l'haptoglobine par la dexaméthasone. Nous montrons que C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  sont induits par les glucocorticoïdes, et transmettent indirectement l'effet des glucocorticoïdes dans les cellules IEC-6. L'effet des glucocorticoïdes sur les niveaux d'ARNm des C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  est probablement transcriptionnel. En effet, les glucocorticoïdes induisent C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  surtout transcriptionnellement dans les cellules IEC-6. Cette régulation mène à une élévation rapide des niveaux de protéines nucléaires de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  (Boudreau et al., 1996; Yu et al., 1999). Plusieurs autres évidences montrent l'importance de la régulation transcriptionnelle de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  par les glucocorticoïdes dans les hépatocytes (Baumann et al., 1992; Matsuno et al., 1996), et par l'AMPc dans plusieurs types cellulaires (Cardinaux et Magistretti, 1996; Niehof et al., 1997), dont les cellules intestinales épithéliales (Pelletier et al., 1998). La mutagénèse des sites Hapto A et Hapto C abolit la réponse à la dexaméthasone. Donc, les sites d'interaction aux C/EBPs sont essentiels à la régulation de l'haptoglobine non seulement par la dexaméthasone (Yu et al., 1999) mais aussi par l'AMPc (Pelletier et al.,

1998). Les C/EBPs sont aussi importants pour l'induction du gène  $\alpha$ -AGP par les glucocorticoïdes dans les cellules intestinales épithéliales (Boudreau et al., 1998).

Le TGF $\beta$  a un rôle modulateur positif ou négatif sur l'expression de plusieurs gènes APPs dans les hépatocytes (Baumann et Gauldie, 1994). De plus, des rôles pro-inflammatoires à court terme et anti-inflammatoires à long terme ont été proposés pour le TGF $\beta$  dans les cellules intestinales épithéliales (Clark et Coker, 1998; Stenson, 1999). Nous montrons que le TGF $\beta$  atténue l'expression de l'haptoglobine au niveau de l'ARNm. Plusieurs évidences montrent que la régulation des C/EBPs et de l'haptoglobine par les glucocorticoïdes et le TGF $\beta$  dans les cellules intestinales épithéliales est surtout transcriptionnelle. Les glucocorticoïdes et l'AMPc induisent les niveaux d'ARNm de l'haptoglobine et des C/EBPs et transactivent le promoteur de l'haptoglobine par transfection transitoire. Le TGF $\beta$  inhibe cette transactivation et atténue aussi les niveaux d'ARNm et de protéines de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  induits par la dexaméthasone. Dans les hépatocytes, le gène haptoglobine et les C/EBPs sont contrôlés transcriptionnellement par les glucocorticoïdes et les cytokines, tel que démontré par run-on, et il n'y pas de régulation post-transcriptionnelle (Mackiewicz, 1997). Nous avons aussi montré que les C/EBPs peuvent transactiver le promoteur de l'haptoglobine, et que la mutation des sites de liaison des C/EBPs au promoteur affecte la transactivation par les glucocorticoïdes et l'AMPc, et la répression par le TGF $\beta$ . L'induction des ARNm de l'haptoglobine par les glucocorticoïdes est tardive, ce qui pourrait exclure une régulation post-transcriptionnelle des C/EBPs et de l'haptoglobine sans faire de run-on. Il est cependant clair que C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  sont des cibles du TGF $\beta$  dans le processus d'atténuation de l'expression du

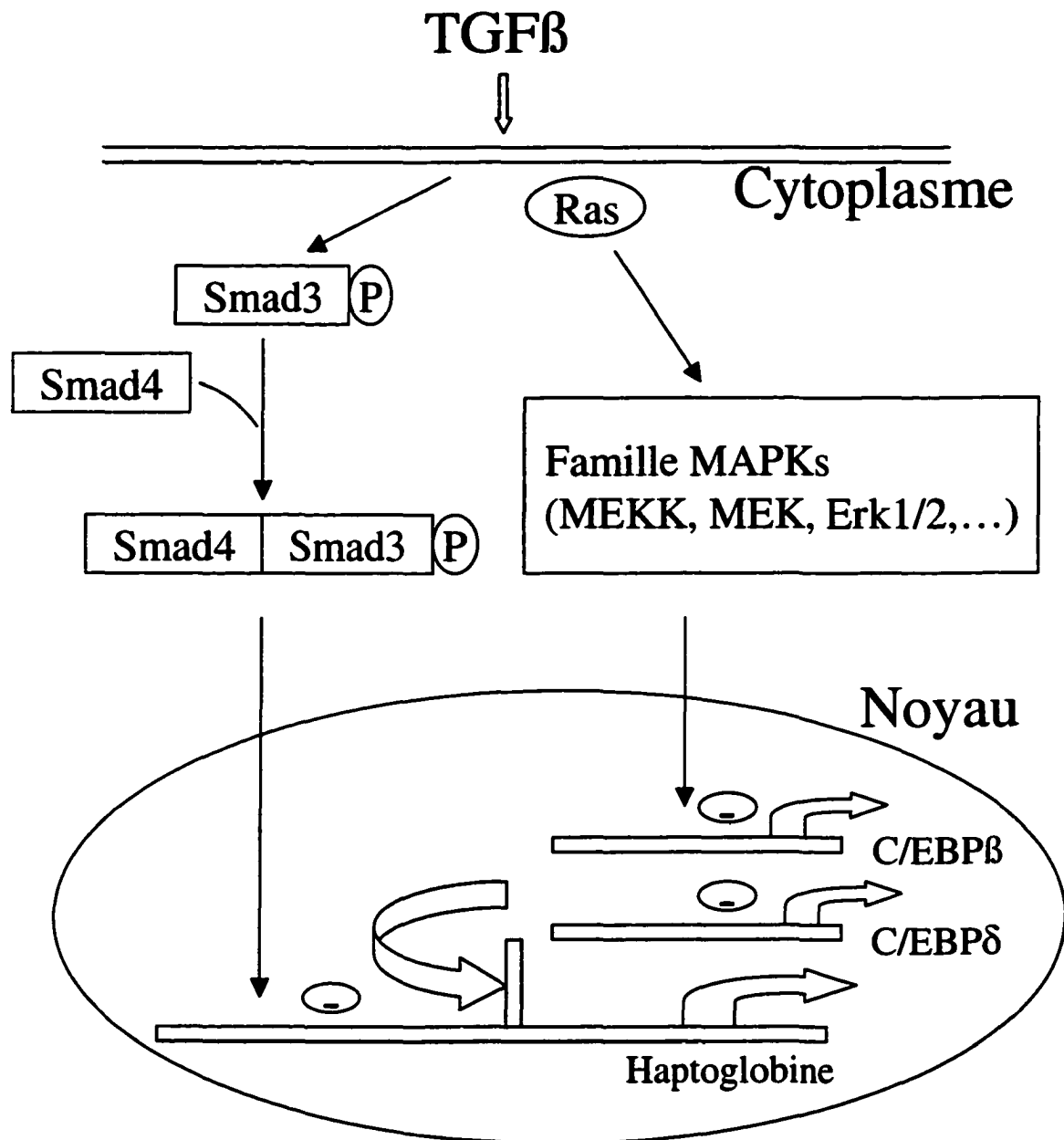
gène haptoglobine, et qu'une diminution des C/EBPs est responsable en partie de l'atténuation de l'expression des gènes de la réponse inflammatoire comme l'haptoglobine (Yu et al., 1999) et l' $\alpha$ -AGP (Boudreau et al., 1998) dans les cellules intestinales épithéliales. Les facteurs de transcription C/EBPs, comme cible indirecte de l'action du TGF $\beta$ , s'ajoutent à plusieurs classes de facteurs de transcription impliqués dans la régulation négative par le TGF $\beta$ . Par exemple, le TGF $\beta$  inhibe l'expression du gène transine/stromélysine en modifiant la composition du complexe AP-1 (fos) liant une séquence AP-1 (Kerr et al., 1990). L'inhibition de l'expression du gène cycline A par le TGF $\beta$  est associée à une modification de l'activation transcriptionnelle des facteurs de transcription ATF1 et CREB (cAMP responsive element binding protein) (Yoshizumi et al., 1997). Enfin, le TGF $\beta$  cause un arrêt du cycle cellulaire en favorisant la formation de complexes E2F-pRb hypophosphorylés, donc en inhibant l'expression de gènes normalement induits par les facteurs de transcription E2F (Li et al., 1997). Nos résultats démontrent que le TGF $\beta$  atténue l'expression de l'haptoglobine en réduisant l'expression des isoformes C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$ . Cette observation suggère l'implication des C/EBPs dans le processus d'atténuation par le TGF $\beta$  dans les cellules intestinales épithéliales (Figure 13).

## **2. LES MAP KINASES p42/p44 SONT IMPLIQUÉES DANS L'ATTÉNUATION DE L'EXPRESSION DE L'HAPTOGLOBINE PAR LE TGF $\beta$**

Nous avons démontré que le TGF $\beta$  induit l'activité des MAP kinases p42/p44 rapidement, et que l'addition du sérum a un effet additif. Nous avons aussi montré que

**Figure 13. Effets du TGF $\beta$  sur les cellules intestinales épithéliales dans le contexte de son action sur le gène haptoglobine.**

Figure 13. Effets du TGF $\beta$  sur les cellules intestinales épithéliales dans le contexte de son action sur le gène haptoglobine



l'addition du PD98059 inhibe l'atténuation de l'expression de l'haptoglobine par le TGF $\beta$ . De plus, un dominant négatif de *ras* induit l'expression de l'haptoglobine dans les cellules IEC-6, suggérant que *ras* est impliqué dans cette voie.

Plusieurs évidences montrent que certains facteurs de croissance, cytokines, et hormones peuvent activer successivement les MAP kinases par cascades de phosphorylation. Les MAP kinases activées transloquent dans le noyau qui contient plusieurs facteurs de transcription phosphorylés par celles-ci (comme CTF/NF-1, Sp-1, AP-1, etc.) (Lee et al., 1996; Dieckgraefe et al., 1997; Derynck et al., 1997). Les voies de signalisation des MAP kinases représentent des mécanismes importants de la transduction des signaux de la surface cellulaire vers le noyau menant à la régulation de l'expression des gènes (Davis et al., 1995). Le TGF $\beta$  peut activer différentes MAP kinases telles que les MAP kinases p42/p44, p38, JNK, TAK1, etc., dépendamment du type cellulaire (Hartsough et Mulder, 1997). Par exemple, le TGF $\beta$  induit JNK/SAPK dans les cellules de cancer du sein (Frey et Mulder, 1997) et p38 dans les cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 (Yamaguchi et al., 1995). TAK1 est aussi une kinase dont l'activation est médiée par le récepteur du TGF $\beta$  dans plusieurs types cellulaires dont les cellules ostéoblastiques, et les cellules Mv1Lu (Yamaguchi et al., 1995). Dans les cellules IEC-6, nous montrons que le TGF $\beta$  induit rapidement et de façon soutenue les MAP kinases p42/p44, alors que p38 et JNK ne sont pas affectées (non montrés). Nos résultats concordent avec ceux de Mulder qui a montré que le TGF $\beta$  induit p42/p44 de façon rapide et soutenue dans les cellules épithéliales intestinales IEC-6 (Hartsough et Mulder, 1995; Frey et Mulder, 1997). De plus, l'activation de *ras* est nécessaire et suffisante à l'activation de p42/p44 (Hartsough et al.,



1995, 1996). Un mutant dominant négatif de *ras* abolit l'induction de p42/p44, suggérant que l'activation de p42/p44 par le TGF $\beta$  dépend de *ras* (Hartsough et al., 1996). Ces résultats concordent avec nos résultats montrant qu'un dominant négatif de *ras* augmente l'expression de l'haptoglobine. Au contraire des travaux de Mulder, nous observons un effet additif du sérum et du TGF $\beta$  sur l'activation de p42/p44. Il est intéressant de mentionner que la présence du sérum est nécessaire à l'activation du TGF $\beta$  sur l'expression de l'haptoglobine (non montré). Ces résultats suggèrent que les cascades des MAP kinases p42/p44 pourraient jouer un rôle important dans la réponse physiologique des cellules intestinales épithéliales en réponse au TGF $\beta$ .

Nos résultats montrent d'une part que *ras* et les MAP kinases p42/p44 sont impliqués dans le processus d'atténuation par le TGF $\beta$  (Figure 13). D'autre part, on ne peut exclure que d'autres kinases (comme TAK1) sont impliquées. En effet, des résultats préliminaires suggèrent que TAK1 pourrait aussi atténuer l'expression de l'haptoglobine.

Plusieurs études démontrent que l'activation des MAPKs p42/p44 joue un rôle important dans la régulation de l'expression des C/EBPs. Par exemple, l'activation des MAP kinases p42/p44 est nécessaire à la répression des niveaux d'ARNm et de protéines C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  stimulés par l'insuline dans les adipocytes 3T3 L1 (Hemati et al., 1997). Cette activation des voies des MAP kinases est aussi requise pour l'expression de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  induits par LIF (leukemia inhibitory factor) dans les cellules préadipeuses (Aubert et al., 1999). Nos résultats montrent que le TGF $\beta$  pourrait affecter négativement les niveaux d'expression de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  en stimulant les voies des

MAP kinases dans les cellules intestinales épithéliales. Il est aussi possible que la capacité de transactivation de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  est modulée par des voies de phosphorylation stimulées par le TGF $\beta$ . En effet, le TGF $\beta$  peut affecter l'activité transcriptionnelle de certains facteurs de transcription par la stimulation de voies de signalisation. Par exemple, la stimulation de p42/p44 par le TGF $\beta$  active les TCFs (comme Elk1) et AP1 successivement (Hartsough et Mulder, 1995). Il est intéressant de constater que C/EBP $\beta$  peut être phosphorylé sur des résidus sérine et thréonine par plusieurs kinases comme p38, p42/p44, PKA, PKC, et CaM kinase (Wegner et al., 1992; Nakajima et al., 1993; Trautwein et al., 1994). C/EBP $\delta$  est phosphorylé sur des résidus tyrosine, ou sérine/thréonine (Ray et Ray, 1994a). Les différentes modifications post-traductionnelles peuvent affecter positivement ou négativement la capacité de liaison à l'ADN ou la transactivation des C/EBPs (Ray et Ray, 1994b; Lee et al., 1996). On pourrait supposer que le TGF $\beta$ , en stimulant différentes voies de signalisation, entraîne des modifications post-traductionnelles des C/EBPs. En plus d'une action directe des kinases sur la liaison à l'ADN et la transactivation de C/EBP $\beta$  et peut-être C/EBP $\delta$ , des modifications des interactions entre les C/EBPs et d'autres facteurs de transcription pourraient survenir. Par exemple, plusieurs évidences montrent que des interactions entre les C/EBPs et d'autres facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B et Sp1 peuvent entraîner des effets additionnels ou synergiques sur l'expression des gènes APPs (Vietor et al., 1996; Matsusaka et al., 1993; Lee et al., 1996). Les interactions entre C/EBP $\beta$  et le co-activateur transcriptionnel p300/CBP mènent à une activité transcriptionnelle synergique (Mink et al., 1997). La phosphorylation pourrait modifier les propriétés d'interaction des C/EBPs à ces facteurs. Encore là, les interactions entre C/EBP $\delta$  et d'autres facteurs de

transcription sont très peu connues. Le rôle du TGF $\beta$  dans la transactivation dépendant de C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  reste à élucider.

### **3. SMAD3 POURRAIT ÊTRE IMPLIQUÉ DANS LE PROCESSUS D'ATTÉNUATION DE L'EXPRESSION DE L'HAPTOGLOBINE PAR LE TGF $\beta$**

Nous avons montré que le TGF $\beta$  induit Smad1 et Smad3, mais non Smad2 dans les cellules intestinales épithéliales. Smad3 atténue l'activité transcriptionnelle du promoteur de l'haptoglobine induit par les C/EBPs (Figure 13). Les Smads sont des facteurs de transcription cytoplasmiques qui sont phosphorylés directement par le récepteur activé du TGF $\beta$  (Baker et Hartland, 1996; Massagué, 1998). Suite à cette phosphorylation, Smad2 et Smad3 forment indépendamment un complexe avec Smad4. Ce complexe est transporté au noyau et lie une séquence spécifique dans les promoteurs des gènes cibles (Dennler et al., 1998). Alors que BMP induit Smad1, TGF $\beta$  induit Smad3. Par contre, le TGF $\beta$  et le BMP peuvent induire la phosphorylation de Smad1 endogène dans les cellules CCL64 (Liu et al., 1996) et dans les cellules IEC-6 (Yue et al., 1999a). Le TGF $\beta$  peut régulariser la fonction de Smad1 dans les cellules épithéliales IEC-6 et les voies Ras/MEK sont requises dans ce processus (Liu et al., 1998; Yue et al., 1999a, 1999b). Nous montrons pour la première fois que le TGF $\beta$  induit à la fois Smad1 et Smad3 dans les cellules IEC-6. D'autre part, plusieurs évidences montrent que Smad3 ou Smad2 pourraient interagir avec d'autres facteurs de transcription tels que FAST1 ou FAST2 pour former un complexe transcriptionnel activé, en recrutant le co-activateur p300/CBP,

ou un complexe transcriptionnel répressif en s'associant au TGIF (TGF $\beta$  inhibitory factor) (Wotton et al., 1999). D'autres interactions sont aussi reconnues. Par exemple, Smad3 diminue l'expression de plusieurs gènes comme la collagénase en empêchant la liaison du facteur de transcription AP-1 (Snail) (YingLing et al., 1997). Dans un autre contexte, des interactions entre AP-1 et les Smads sont nécessaires à l'activation du promoteur de c-jun (Wong et al., 1999). Nos observations ne peuvent exclure que le complexe Smad3 interagisse ou co-opère avec d'autres facteurs de transcription dans le processus d'atténuation de l'expression de l'haptoglobine par le TGF $\beta$ . Le promoteur de l'haptoglobine ne lie pas les Smads (non montré). Smad3 pourrait interagir avec les C/EBPs en inhibant la liaison de ces protéines à l'ADN ou leur capacité de transactivation. Smad3 pourrait avoir un effet indirect en interagissant avec d'autres facteurs de transcription liant le promoteur de l'haptoglobine, ou en interagissant avec des co-activateurs importants pour l'induction de l'haptoglobine par les C/EBPs. Nos résultats ne permettent pas de choisir entre ces hypothèses, et cela reste à confirmer dans nos travaux futurs. D'autre part, l'activation des MAP kinases p42/p44 par le TGF $\beta$  peut être nécessaire à la translocation des Smads. Certaines études semblent démontrer que la transformation par des oncogènes comme *ras*, qui affectent la voie des MAP kinases impliquées dans la phosphorylation de Smad2 et Smad3, inhibent la translocation de Smad2 et Smad3 au noyau (Kretschmar et al., 1999). Des expériences supplémentaires seraient nécessaires afin de déterminer si l'induction des MAP kinases par le TGF $\beta$  pourrait atténuer la translocation des Smads dépendante de l'activation de la voie du TGF $\beta$ .

## V. CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Nous montrons que le gène haptoglobine est induit par la dexaméthasone. Le TGF $\beta$  atténue l'expression de l'haptoglobine induite par la dexaméthasone. Les facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  sont impliqués dans la réponse secondaire aux glucocorticoïdes. Le TGF $\beta$  réduit l'expression des C/EBPs et atténue aussi indirectement l'expression des gènes APPs. Les isoformes C/EBPs jouent donc un rôle important dans la régulation des gènes APPs dans l'épithélium intestinal puisque les facteurs de transcription C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  sont impliqués à la fois dans l'induction par les glucocorticoïdes et dans l'atténuation par le TGF $\beta$  de l'expression de l'haptoglobine. Nos observations suggèrent aussi un mécanisme potentiel de l'activité anti-inflammatoire du TGF $\beta$  dans les cellules épithéliales intestinales.

Les mécanismes moléculaires d'action du TGF $\beta$  sur la régulation de l'expression des gènes APPs lors de la réponse inflammatoire sont encore très peu connus. Plusieurs évidences montrent que le TGF $\beta$  peut réguler l'expression des gènes cibles en agissant indirectement sur différentes classes de facteurs de transcription comme AP1 et CREB (Kerr et al., 1990). Nous montrons que les C/EBPs forment une nouvelle classe de facteurs de transcription impliqués dans la transduction de la signalisation contrôlée par le TGF $\beta$ .

Nos résultats suggèrent aussi que les MAP kinases p42/p44 sont requises pour atténuer l'expression de l'haptoglobine par le TGF $\beta$  dans les cellules intestinales épithéliales, et que la voie impliquant *ras* pourrait être utilisée. Le TGF $\beta$  pourrait atténuer l'expression de ce gène indirectement en réprimant les isoformes C/EBPs ou directement, par l'intermédiaire de Smad3. De plus, les MAP kinases p42/p44 sont impliquées dans une voie de signalisation initiée par le TGF $\beta$  et entraînant une atténuation de l'expression du gène haptoglobine.

Pour déterminer les voies impliquées dans la signalisation par le TGF $\beta$ , nous pouvons utiliser des approches de transfection transitoire avec dominant négatif ou positif des kinases. De plus, comme les C/EBPs sont impliqués dans l'atténuation de l'expression de l'haptoglobine par le TGF $\beta$ , nous pourrions vérifier l'effet du PD98059 sur les ARNm des C/EBPs en réponse au TGF $\beta$  et aux glucocorticoïdes. La possibilité d'interactions entre les facteurs de transcription C/EBPs et les Smads pourrait aussi être évaluée. Des approches de co-immunoprécipitation en utilisant des anticorps spécifiques contre les protéines étudiées pourraient être utilisées. D'autre part, nous pouvons vérifier l'effet du TGF $\beta$  et de certaines kinases sur la transactivation des C/EBPs. Pour déterminer cette régulation par le TGF $\beta$ , une approche intéressante pourrait être l'utilisation de protéines telles que la protéine Gal4 fusionnée aux mutants de délétion des protéines C/EBPs. Les régions de transactivation pourraient être identifiées par transfection transitoire avec différents dominant négatif ou dominant positif des MAP kinases. Ces études futures nous permettront de mieux comprendre les mécanismes de régulation des C/EBPs en réponse au TGF $\beta$  dans les cellules intestinales épithéliales.

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier, mon directeur de recherche, le docteur Claude Asselin, pour m'avoir donné la chance d'apprendre autant de connaissances scientifiques et d'expériences, et de m'avoir permis de mener ce travail dans une atmosphère de motivation et d'apprentissage. Il n'a cessé de me donner toute sa confiance et ses connaissances pour mon travail. J'aimerais remercier la docteure Nathalie Rivard pour son aide tout au long de mes études.

Je tiens aussi à remercier Antoine Désilets pour son soutien et pour sa camaraderie au cours de mes études.

Enfin, je remercie tous les professeurs, secrétaires, techniciennes et techniciens, et les étudiantes et étudiants du département pour leur aide, leur appui, et leur amitié.

## RÉFÉRENCES

Alevizopoulos A., et Mermod N. (1997). Transforming growth factor- $\beta$ : the breaking open of a black box. *BioEssays* 19: 581-591.

Asselin C., Nepveu A., et Marcu K.B. (1989). Molecular requirements for transcriptional initiation of the c-myc gene. *Oncogene* 4: 549-558.

Aubert J., Dessolin S., Belmonte N., Li M., McKenzie F.R., Staccini L., Villageois P., Barhanin B., Vernallis A., Smith A.G., Ailhaud G., et Dani C. (1999). Leukemia inhibitory factor and its receptor promote adipocyte differentiation via the mitogen-activated protein kinases cascade. *J. Biol. Chem.* 274: 24965-24972.

Babyatsky M.W., et Podolsky D.K. (1999). (Yamada, Alpers, Laine, Owyang, et Posell, (eds)). Growth and Development of the Gastrointestinal Tract. In : *Textbook of Gastroenterology*, 3rd edition, Lippincott, Williams & Wilkins, pp. 547-584.

Babyatsky M.W., Rossiter G., et Podolsky D.K. (1996). Expression of transforming growth factors  $\alpha$  and  $\beta$  in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 110: 975-984.



Baker J.C., et Harland R.M. (1996). A novel mesoderm inducer : *Madr2* functions in the activin signal transduction pathway. *Genes Dev.* 10: 1880-1889.

Baumann H., et Gauldie J. (1994). The acute phase response. *Immunol. Today* 15: 74-80.

Baumann H., Morella K.K., Campos S.P., Cao Z., et Jahreis G.P. (1992). Role of CCAAT-enhancer binding protein isoforms in the cytokine regulation of acute-phase plasma protein genes. *J. Biol. Chem.* 267: 19744-19751.

Birkenmeier E.H., Gwynn B., Howard S., Jerry J., Gordon J.I., Landschulz W.H., et McKnight S.L. (1989). Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes Dev.* 3: 1146-1156.

Blais S., Boudreau F., Beaulieu J-F., et Asselin C. (1995). CCAAT/enhancer binding protein isoforms expression in the colon of neonatal mice. *Dev. Dyn.* 204: 66-76.

Blais S., Boudreau F., Thormeloe K., et Asselin C. (1996). Differential expression of *fos* and *jun* family members during murine post-natal intestinal development. *Biol. Neonate* 69: 342-349.

Bossone S.A., Asselin C., Patel A.J., et Marcu K.B. (1992). MAZ, a zinc finger protein, binds to c-MYC and C2 gene sequences regulating transcriptional initiation and

termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7452-7456.

Boudreau F., Bardati T., Nadeau A., Blouin R., et Asselin C. (1997). Differential expression of acute phase response protein genes during inflammation of the rat intestine. *Gastroenterology* 112 (suppl.): A940.

Boudreau F., Blais S., et Asselin C. (1996). Regulation of CCAAT/Enhancer binding protein isoforms by serum and glucocorticoids in the rat intestinal epithelial crypt cell line IEC-6. *Exp. Cell Res.* 222: 1-9.

Boudreau F., Yu S. J., et Asselin C. (1998). CCAAT/enhancer binding protein beta and delta regulate  $\alpha$ 1-acid glycoprotein gene expression in rat intestinal epithelial cells. *DNA Cell Biol.* 17: 669-677.

Burgess-Beusse B.L., et Darlington G. J. (1998). C/EBP $\alpha$  is critical for the neonatal acute-phase response to inflammation. *Mol. Cell. Biol.* 18: 7269-7277.

Campos S.P., Wang Y., Koj A., et Baumann H. (1993). Divergent transforming growth factor-beta effects on IL-6 regulation of acute phase plasma proteins in rat hepatoma cells. *J. Immunol.* 151: 7128-7137.

Cao Z., Umek R.M., et McKnight S.L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 5: 1538-1552.

Cardinaux J.R., et Magistretti P.J. (1996). Vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, and noradrenaline induce the transcription factors CCAAT/enhancer binding protein C/EBP $\beta$  and C/EBP $\delta$  in mouse cortical astrocytes: involvement in cAMP-regulated glycogen metabolism. *J. Neurosci.* 16: 919-929.

Chomczynski D., et Sacchi N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159.

Clark D. A., et Coker R. (1998). Transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 30: 293-298.

Davis R.J. (1995). Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol. Reproduct. Dev.* 42: 459-467.

Dennler S., Itoh S., Vivien D., Dijke P.T., Huet S., et Gauthier J.M. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF $\beta$ -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* 17: 3091-3100.

Derynck R., et Feng X.H. (1997). TGF- $\beta$  receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1333: F105-F150.

Dieckgraefe B. K., Weems D.M., Santoro S.A., et Alpers D. H. (1997). Erk and p38

MAP kinases pathways are mediators of intestinal epithelial wound-induced signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233: 389-394.

Dignass A.U., Stow J.L., et Babyatsky M.W. (1996). Acute epithelial injury in the rat small intestine in vivo is associated with expanded expression of transforming growth factor  $\alpha$  and  $\beta$ . *Gut* 38: 687-693.

Fiocchi C. (1997). Intestinal inflammation: a complex interplay of immune and nonimmune cell interactions. *Am. J. Physiol.* 273: G769-G775.

Fiocchi C. (1998). Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 115: 182-205.

Fiocchi C., et Podolsky D. K. (1995). (Kirsner J.B. et Shorter R.G. (ed)). Cytokines and growth factors in inflammatory bowel disease. In : *Inflammatory Bowel Disease*, 4th edition, Williams & Wilkins, Maryland, pp. 252-280.

Fourney R.M., Miyakoski J., Day III R.S., et Paterson M.C. (1988). Northern blotting : efficient RNA staining and transfer. *Focus* 10: 5-6.

Frey R.S., et Mulder K.M. (1997). Involvement of ERK2 and SAPK/JNK activation by TGF $\beta$  in the negative growth control of breast cancer cells. *Cancer Res.* 57: 628-633.

Friedman A.D., Landscholz W.H., et McKnight S.L. (1989). CCAAT/enhancer binding protein activates the promoter of the serum albumin gene in cultured hepatoma cells. *Genes Dev.* 3: 1314-1322.

Gordon J.I., et Hermiston M.L. (1994). Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6: 795-803.

Grande J. P. (1997). Role of transforming growth factor- $\beta$  in tissue injury and repair. *Exp. Biol. Med.* 214: 27-40.

Hartsough M.T., Frey R.S., Zipfel P.A., Buard A., Cook S.J., McCormick F., et Mulder K.M. (1996). Altered transforming growth factor signaling in epithelial cells when ras activation is blocked. *J. Biol. Chem.* 271: 22368-22375.

Hartsough M.T., et Mulder K.M. (1995). Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 270: 7117-7124.

Hartsough M.T., et Mulder K.M. (1997). Transforming growth factor- $\beta$  signaling in epithelial cells. *Pharmacol. Therap.* 75: 21-41.

Heldin C.H., Miyazono K., et Dijke P.T. (1997). TGF $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390: 465-471.

Hemati N., Ross S.E., Erickson R.L., Groblewski G.E., et MacDougald O.A. (1997). Signaling pathways through which insulin regulates C/EBP phosphorylation and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 25913-25919.

Hermiston M.L., Simon T.C., et Crossman M.W. (1994). (Johnson L.R. (ed)). Model systems for studying cell fate specification and differentiation in the gut epithelium. In : *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3rd edition, Raven Press, New York, pp. 521-569.

Hu P.P.-C., Datto M.B., et Wang X.F. (1998). Molecular mechanisms of transforming growth factor- $\beta$  signaling. *Endocrine Rev.* 19: 349-363.

Johnson P.F. (1993). Identification of C/EBP basic region residues involved in DNA sequence recognition and half-site spacing preference. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6919-6930.

Karam S.M. (1999). Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front. Biosci.* 4: 286-298.

Kerr L.D., Miller D.B., et Matrisian L.M. (1990). TGF $\beta$ 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a fos binding sequence. *Cell* 61: 267-278.

Ko T.C., Yu W.S., Sakai T., Sheng H., Shao J., Beauchamp R.D., et Thompson E.A.

(1998). TGF $\beta$ 1 effects on proliferation of rat intestinal epithelial cells are due to inhibition of cyclin D1 expression. *Oncogene* 16: 3445-3454.

Koj A. (1996). Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim. Biophys. Acta* 1317: 84-94.

Koj A. (1998). Termination of acute-phase response : role of some cytokines and anti-inflammatory drugs. *Gen. Pharmacol.* 31: 9-18.

Koj A., Gauldie J., et Baumann H. (1993). Biological perspective of cytokine and hormone networks. In *Acute Phase Proteins*. CRC Press, Boca Raton, FL. *Mol. Biol. Biochem. Clin. Appl.* 1: 275-287.

Kretzschmar M., Doody J., Timokhina I., et Massagué J. (1999). A mechanism of repression of TGF $\beta$ /Smads signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.* 13: 804-816.

Kulkarni A.B., Huh C-G., Becker D., Geiser A., Lyght M., Flanders K.C., Roberts A.B., Sporn M.B., Ward J.M., et Karlsson S. (1993). Transforming growth factor beta-1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 770-774.

Kulkarni A.B., et Karlsson S. (1993). Transforming growth factor beta-1 knock-out mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am. J. Pathol.*

143: 3-9.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Landschulz W.H., Johnson P.F., et McKnight S.L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1764.

Lee J.C., et Young P.R. (1996). Role of CSBP/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J. Leuk. Biol.* 59: 152-157.

Lee Y.M., Miao L.H., Chang C.J., et Lee S.C. (1996). Transcriptional induction of the  $\alpha$ 1- acid glycoprotein (AGP) gene by synergistic interaction of two alternative activator forms of AGP/enhancer-binding protein (C/EBP $\beta$ ) and NF- $\kappa$ B or Nopp140. *Mol. Cell. Biol.* 16: 4257-4263.

Lemischka I.R., Farmer S., Racaniello V.R., et Sharp P.A. (1981). Nucleotide sequence and evolution of a mammalian  $\alpha$ -tubulin messenger RNA. *J. Mol. Biol.* 15: 101-120.

Li J.M., Hu P. P-C., Shen X., Yu Y., et Wang X.F. (1997). E2F4-RB and E2F4-p107 complexes suppress gene expression by transforming growth factor  $\beta$  through E2F binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4948-4953.



Lin F.T., et Lane M.D. (1992). Antisense CCAAT/enhancer binding protein RNA suppresses coordinate gene expression and triglyceride accumulation during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Genes Dev.* 6: 533-544.

Lin F.T., et Lane M.D. (1994). CCAAT/enhancer binding protein is sufficient to initiate the 3T3-L1 adipocyte differentiation program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8757-8761.

Liu F., Hata A., Baker J.C., Doody J., Carcamo J., Harland R.M., et Massagué J. (1996). A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. *Nature* 381: 620-623.

Liu X., Yue J., Frey R.S., Zhu Q., et Mulder K.M. (1998). Transforming growth factor beta signaling through Smad1 in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 58: 4752-4757.

Macias-Silva M., Abdollah S., Hoodless P.A., Pirone R., Attisano L., et Wrana J.L. (1996). MADR2 is a substrate of the TGF $\beta$  receptor and phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87: 1215-1224.

Mackiewicz A. (1997). Acute phase proteins and transformed cells. *Int. Rev. Cytol.* 170: 225-300.

Marinkovic S., et Baumann H. (1990). Structure, hormonal regulation and identification of the interleukin-6- and dexamethasone- responsive element of the rat haptoglobin gene. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1573-1583.

Massagué J. (1998). TGF- $\beta$  signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 753-791.

Matsuno F., Chowdhury S., et Gotoh T. (1996). Induction of the C/EBP $\beta$  gene by dexamethasone and glucagon in primary-cultured rat hepatocytes. *J. Biochem.* 119: 524-532.

Matsusaka T., Fujikawa K., et Nishio Y. (1993). Transcription factors NF-IL6 and NF- $\kappa$ B synergically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 10193-10197.

Mink S., Haenig B., et Klempnauer K.F. (1997). Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBP $\beta$ . *Mol. Cell. Biol.* 17: 6609-6617.

Molmenti E.P., Ziambaras T., et Perlmutter D.H. (1993). Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 268: 14116-14124.

Murphy M.S. (1998). Growth factors and the gastrointestinal tract. *Nutrition* 14: 771-774.

Nakajima T., Kinoshita S., et Sasagawa T. (1993). Phosphorylation at threonine-235 by a

*ras*-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2207-2211.

Natsuka S., Isshiki H., Akira S., et Kishimoto T. (1991). Augmentation of haptoglobin production in Hep3B cell line by nuclear factor NF-IL6. *FEBS Lett.* 291: 58-62.

Niehof M., Manns M.P., et Trautwein C. (1997). CREB controls LAP/C/EBP beta transcription. *Mol. Cell. Biol.* 17: 3600-3613.

Nishio Y., Isshiki H., Kishimoto T., et Akira S. (1993). A nuclear factor for interleukin-6 expression (NF-IL6) and the glucocorticoid receptor synergically activate transcription of the rat  $\alpha$ 1-acid glycoprotein gene via direct protein-protein interaction. *Mol. Cell. Biol.* 13: 1854-1862.

Pajovic S., Jones V.E., Prowse K.R., Berger F.G., et Baumann H. (1994). Species-specific changes in regulatory elements of mouse haptoglobin genes. *J. Biol. Chem.* 269: 2215-2224.

Park E.A., Gurney A.L., et Nizielski S.E. (1993). Relative roles of CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  and cAMP regulatory element binding protein in controlling transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP). *J. Biol. Chem.* 268: 613-619.

Pelletier N., Boudreau F., Yu S.J., Zannoni S., Boulanger V., et Asselin C. (1998). Activation of haptoglobin gene expression by cAMP involves CCAAT/enhancer-binding protein isoforms in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett.* 439: 275-280.

Perdue M.H., et McKay D.M. (1994). Integrative immunophysiology in the intestinal mucosa. *Am. J. Physiol.* 267: G151-G165.

Piechaczyk M., Blanchard L., Marty C., Dani F., Panatieres S., Sabouty P., et Jeanteur P.H. (1987). Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase gene expression in rat tissues. *Nucl. Acids Res.* 12: 6951-6963.

Podolsky D. K. (1999). Mucosal immunity and inflammation V. Innate mechanisms of mucosal defence and repair: the best offence is a good defence. *Am. J. Physiol.* 277: G495-G499.

Poli V. (1998). The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J. Biol. Chem.* 273: 29279-29282.

Polyak K. (1996). Negative regulation of cell growth by TGF $\beta$ . *Biochim. Biophys. Acta* 1242: 185-199.

Potten C.S., et Loeffler M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties: lessons for and from the crypt. *Development* 110: 1001-1020.

Quaroni A., et May R.J. (1980). Establishment and characterization of intestinal epithelial cell cultures. *Meth. Cell Biol.* 21B: 403-427.

Ray A., et Ray B.K. (1994a). Serum amyloid A gene expression under acute-phase conditions involves participation of inducible C/EBP $\beta$  et C/EBP $\delta$  and their activation by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 14: 4324-4332.

Ray B.K., et Ray A. (1994b). Expression of the gene encoding  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in the rabbit liver under acute-phase conditions involves induction and activation of  $\beta$  and  $\delta$  CCAAT-enhancer binding proteins. *Eur. J. Biochem.* 222: 891-900.

Ryden T.A., et Beemon K. (1989). Avian retroviral long terminal repeats bind CCAAT/enhancer-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 9: 1155-1164.

Salier J.P., Rouet P., Banine F., et Claeysens S. (1997). Transcription des gènes de protéines plasmatiques dans le foie au cours de l'inflammation aiguë systémique. *Médecines/Sciences.* 13: 335-344.

Sambrook J., Fritsch E.F., et Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Samuelsson L., Stromberg K., Uikman K., Bjursell G., et Enerback S. (1991). The

CCAAT/enhancer binding protein and its role in adipocyte differentiation : evidence for direct involvement in terminal adipocyte development. *EMBO J.* 10: 3787-3793.

Sartor R.B. (1994). Cytokines in intestinal inflammation : pathophysiological and clinical considerations. *Gastroenterology* 106: 533-539.

Screpanti I., Romani L., et Musiani P. (1995). Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP $\beta$ -deficient mice. *EMBO J.* 14: 1932-1941.

Stadnyk A.W., et Waterhouse C.C.M. (1997). Epithelial cytokines in intestinal inflammation and mucosal immunity. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 13: 510-517.

Stein B., Rahmsdorf H.J., Steffer A., Litfin M., et Herrlich P. (1989). UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type I, collagenase, c-fos and metallothionein. *Mol. Cell. Biol.* 9: 5169-5181.

Stenson W.F. (1999). (Yamada T. (ed)). Gastrointestinal Inflammation. In : Textbook of Gastroenterology, 3rd edition, Lippincott, Williams & Wilkins publisher, Philadelphia, pp. 123-140.

Takiguchi M. (1998). The C/EBP family of transcription factors in the liver and other organs. *Int. J. Exp. Path.* 79: 369-391.

Trautwein C., Vander G.P., Karin M., Hunter T., et Chojker M. (1994). Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP modulate its binding affinity to DNA recognition elements. *J. Clin. Invest.* 93: 2554-2561.

Umek R.M., Friedman S.L., et McKnight S.L. (1991). CCAAT-enhancer binding protein: a component of a differentiation switch. *Science* 251: 288-292.

Vietor I., Oliveira I.C., et Vilcek J. (1996). CCAAT box enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP- $\alpha$ ) stimulates kappaB element-mediated transcription in transfected cells. *J. Biol. Chem.* 271: 5595-5602.

Wang N.D., Finegold M.J., Bradley A., Ou C.N., Abdelsayed S.V., Wilde M.D., Taylor L.R., Wilson D.R., et Darlington G.J. (1995). Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269: 1108-1112.

Wegner M., Cao Z., et Rosenfeld M.G. (1992). Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP $\beta$ . *Science* 256: 370-373.

Whitman M. (1998). Smads and early developmental signaling by the TGF $\beta$  superfamily. *Genes Dev.* 12: 2445-2462.

Wong C., Rougier-Chapman E.M., Frederick J.P., Datto M.B., Liberati N.T., Li J.M., et Wang X.F. (1999). Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional

activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor beta. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1821-1830.

Wotton D., Lo R.S., Lee S., et Massagué J. (1999). A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 97: 29-39.

Yamaguchi K., Shirakabe K., Shibuya H., et Matsumoto K. (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF $\beta$  signal transduction. *Science* 270: 2008-2011.

Yeh W.C., Cao Z.D., Classon M., et McKnight S. (1995). Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins. *Genes Dev.* 9: 168-181.

YingLing J.M., Datto M.B., Wong C., Frederick J.P., Liberati N.T., et Wang X.F. (1997). Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 17: 7019-7028.

Yoshizumi M., Wang H., Hsieh C.M., Sibinga N.E.H., Perrella M.A., et Lee M.N. (1997). Down-regulation of the cyclin A promoter by TGF- $\beta$ 1 associated with a reduction in phosphorylated activating transcription factor-1 and cyclic AMP-responsive element-binding protein. *J. Biol. Chem.* 272: 22259-22264.



Yu S.J., Boudreau F., Désilets A., Houde M., Rivard N., et Asselin C. (1999). Attenuation of haptoglobin gene expression by TGF $\beta$  requires the MAP kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 259: 544-549.

Yue J., Buard A., et Mulder K.M. (1998). Blockade of TGF $\beta$ 3 up-regulation of p27kip1 and p21cip1 by expression of Ras N17 in epithelial cells. *Oncogene* 17: 47-55.

Yue J., Frey R.S., et Mulder K.M. (1999a). Cross-talk between the Smad1 and Ras/MEK signaling pathways for TGF beta. *Oncogene* 18: 2033-2037.

Yue J., Hartsough M.T., Frey R.S., Frielle T., et Mulder K.M. (1999b). Cloning and expression of rat Smad1: regulation by TGF beta and modulation by the Ras/MEK pathway. *J. Cell. Physiol.* 178: 387-396.